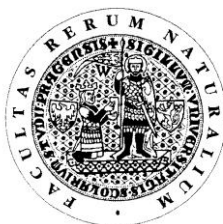


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lenka Tomešová

ANALÝZA KUTIKULÁRNÍCH EXTRAKTŮ ČMELÁKŮ  
DRUHU *BOMBUS TERRESTRIS*

Analysis of cuticular extracts  
of bumblebees species *Bombus terrestris*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Irena Valterová, CSc.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a projektu TA01020969 Technologické agentury České republiky.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 21. srpna 2013

.....

Podpis

## Abstrakt

Během kopulačního chování *Bombus terrestris* dochází k přenosu chemických látek mezi samcem a královnou. Předané látky se vyskytují převážně na jejich kutikule. Předmětem této práce bylo určit rozdíly v zastoupení povrchových látek mezi definovanými skupinami jedinců – spáření, nespáření a o spáření se pokoušející. Kutikulární extrakty byly získány oplachem jedinců hexanem. Pro analýzu hexanových extraktů byla používána metoda dvoudimenzionální plynové chromatografie s průletovým hmotnostním analyzátozem GCxGC-TOF/MS.

Byla provedena úplná identifikace a semi-kvantifikace kutikulárních uhlovodíků. U heptakosenu a nonakosenu byly určeny polohy dvojných vazeb. Dále bylo identifikováno 5 látek –  $\beta$ -springen,  $\alpha$ -springen, dihydrofarnesyl-oleát, palmityl-palmitát a palmityl-palmitoleát, které tvořily rozdíly mezi skupinami těchto jedinců.

Bylo zjištěno, že pomocí analýzy látek na povrchu kutikuly bylo možné poznat, zda jedinec byl či nebyl spářený. Dále bylo možné pozorovat statisticky významné rozdíly v zastoupení látek u jednotlivých skupin – spáření, nespáření a o spáření se pokoušející jedinci.

**Klíčová slova:** dvoudimenzionální plynová chromatografie, *Bombus terrestris*, kutikulární extrakt

## Abstract

Chemical substances are transferred between bumblebees of the species *Bombus terrestris* during their mating behavior. These substances are present mainly on the cuticle. The aim of this thesis was to identify and quantitatify differences in the amount of the compounds among defined groups of bumblebees – mated, non-mated and attempting to mate. Cuticular extracts were obtained by washing of the whole bumblebees bodies in hexane. These extracts were analyzed by using a two-dimensional gas chromatography with the time of fly mass spectrometr (GCxGC-TOF/MS).

Cuticular hydrocarbons were identified and semi-quantified. Double bounds locations were determined in heptacosene and nonacosene. Five compounds were differed in the examined groups –  $\beta$ -springene,  $\alpha$ -springene, dihydrofarnesyl-oleate, palmityl-palmitate and palmityl-palmitoleate. By comparing of the amount of these compounds differences between defined groups of bumblebees were determined.

Analysis of the cutilar extracts showed that mated and non-mated bumblebees can be distinguished. Furthermore, there were statistically significant differences in the amounts of identified compounds in all defined groups of bumblebees.

**Key words:** two-dimensional gas chromatography, *Bombus terrestris*, cutilar extract

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda srdečně poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Ireně Valterové, CSc. za odborné vedení mé práce, cennou pomoc a podporu.

Za odborné konzultace, trpělivé vedení, poskytnuté zkušenosti a neocenitelnou pomoc bych chtěla poděkovat Mgr. Petru Žáčkovi.

Dále děkuji Dr. Oldřichu Hovorkovi za zpracování biologického materiálu a odborné konzultace v oblasti biologie.

Za poskytnutí biologického materiálu děkuji Mgr. Aleně Votavové z Výzkumného ústavu pícninářského, spol. s.r.o. Troubsko.

Za zprostředkování zajímavého tématu a pomoc děkuji svému konzultantu RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D.

Mé díky patří všem kolegům z laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Za cennou pomoc a předání mnoha zkušeností děkuji především svým kolegům Janě Krasulové, Pavlu Jirošovi, Anně Jirošové, Kláře Urbanové a Anně Nekolové.

Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za celkovou podporu, trpělivost a umožnění studia.

# Obsah

Seznam zkratk a symbolů.....	8
<b>1 Úvod.....</b>	<b>9</b>
1.1 Cíl práce.....	11
<b>2 Teoretická část.....</b>	<b>12</b>
2.1 Základní informace o čmelácích.....	12
2.1.1 Páření .....	12
2.1.2 <i>Bombus terrestris</i> .....	14
2.2 Chemická komunikace.....	15
2.2.1 Feromony.....	15
2.3 Exokrinní žlázy.....	16
2.3.1 Labiální žláza.....	16
2.3.1 Mandibulární žláza.....	18
2.3.3 Tarsální žláza.....	19
2.3.4 Tendonová žláza.....	19
2.3.5 Dufourova žláza.....	19
2.4 Analýza infochemikálií.....	20
2.4.1 Základní informace o GCxGC .....	21
2.4.1.1 Instrumentace.....	25
2.4.1.2 Porovnání GCxGC s GC.....	27
2.4.3 Určení polohy dvojné vazby.....	27
2.5 Statistické zpracování dat.....	29
<b>3 Experimentální část.....</b>	<b>31</b>
3.1 Biologický materiál.....	31
3.2 Chemikálie.....	32
3.3 Výběr vhodného rozpouštědla.....	32
3.4 Analýza kutikulárních oplachů.....	32
3.4.1 Příprava vzorků.....	33
3.4.2 Chromatografická analýza.....	33
3.5 Stanovení poloh dvojných vazeb.....	35
3.6 Zpracování dat.....	37

<b>4 Výsledky a diskuze</b>	38
4.1 Identifikace látek	38
4.1.1 Stanovení uhlovodíků	38
4.1.2 Stanovení látek ve stopovém množství	40
4.1.2.1 Identifikace springenů	41
4.1.2.2 Identifikace vosků	44
4.2 Grafické znázornění zastoupení jednotlivých látek	45
4.2.1 Určení vhodného rozpouštědla	45
4.2.2 Uhlovodíky	47
4.2.3 Látky voskového a terpenického charakteru	49
4.3 Spojitosti mezi jedinci v rámci zastoupení stopových látek	52
4.4 Určení polohy dvojné vazby	54
<b>5 Závěr</b>	58
Přehled bibliografických citací	60

## Seznam zkratk a symbolů

1D	první dimenze
2D	druhá dimenze
C27	heptakosan, analogicky u zbylých uhlovodíků (C20-C33)
C27=	heptakosen, analogicky u zbylých uhlovodíků (C23=, C25=, C27=, C29=, C31= a C33=)
C31,2x=	hentriakonten s dvěma $\pi$ vazbami, analogicky u C33,2x=
BT	<i>Bombus terrestris</i>
DMDS	dimethyldisulfid
EI	elektronová ionizace
FID	plamenový ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GCxGC	komprehenzivní dvoudimenzionální plynová chromatografie
GCxGC-TOF/MS	komprehenzivní dvoudimenzionální plynová chromatografie spojená s hmotnostním detektorem s průletovým analyzátozem
CHCl <sub>3</sub>	chloroform
MS	hmotnostní spektrometr
RI	retenční index
SCH <sub>3</sub>	methylsulfidová skupina
TOF	„Time of flight“, průletový analyzátoz

## Seznam látek

palmityl-palmitát	hexadecyl-hexadekanoát
palmityl-palmitoleát	hexadecyl-hexadec-9-enoát
dihydrofarnesyl-oleát	dihydrofarnesyl-oktadec-9-enoát
$\beta$ -springen	( <i>E,E</i> )-7,11,15-trimethyl-3-methylene-hexadeka-1,6,10,14-tetraen
$\alpha$ -springen	( <i>E,E,E</i> )-3,7,11,15-tetramethylhexadeka-1,3,6,10,14-pentaen
citronellol	3,7-dimethylokt-6-en-1-ol
kys. linolová	oktadeka-9,12-dienová kyselina
kys. myristová	tetradekanová kyselina
kys. máselná	butanová kyselina
kys. stearová	oktadekanová kyselina



# 1 Úvod

V posledních 30 letech zaznamenal výzkum chemické komunikace mezi živými organismy významný rozvoj. Touto tematikou se zabývá vědní obor chemická ekologie, která byla definována poměrně nedávno (v 70. letech). Tento obor se pohybuje na hranici mezi tradičními disciplínami chemií a biologií<sup>1,2</sup>. Nejvíce pozornosti je věnováno látkám produkovaným hmyzem ke vzájemné komunikaci. Chemické signály jsou pravděpodobně nejstarší formou komunikace mezi živými organismy. Díky studiu chemické komunikace můžeme lépe porozumět vnitrodruhovým a mezidruhovým vztahům živých organismů<sup>3</sup>.

Chemické signály jsou zprostředkovány různými typy biologicky aktivních látek a plní rozdílné funkce. Při chemické komunikaci organismus vylučuje nebo rozpoznává látky zvané semiochemikálie. Pro vnitrodruhovou komunikaci nazýváme semiochemikálie feromony<sup>3</sup>. Feromony jsou obsaženy v sekretech, které jsou produkovány exokrinními žlázami<sup>4</sup>.

Chemické komunikace využívá nejvíce sociální hmyz – mravenci, včely, čmeláci atd.<sup>3,5</sup>. Ve srovnání se včelami máme k dispozici jen zlomek informací o komunikaci primitivně eusociálního hmyzu, jako jsou čmeláci<sup>2</sup>. Čmeláci mají primitivnější sociální chování oproti vysoce socializovanému společenství včel či mravenců<sup>3</sup>. V posledních letech vzrostl zájem o čmeláky jakožto významné opylovače skleníkových plodin<sup>5</sup>.

Feromony hrají významnou roli během kopulačního chování čmeláků. Samci svými sekrety lákají královny a následně dochází ke kopulaci. Před kopulací i během kopulace jsou jedinci v úzkém kontaktu a dochází mezi nimi k přenosu chemických látek. Na kutikule čmeláka jsou přítomny žlázové sekrety, jejichž analýzou mohou být identifikovány látky, které hrají významnou roli v jejich sexuálním chování<sup>3</sup>. Vědomosti o těchto látkách a jejich funkcích jsou velmi užitečné jak z biologického hlediska, tak i pro vylepšení podmínek v umělých chovech čmeláků.

V našich experimentech byly analyzovány kutikulární extrakty u definovaných skupin čmeláků – spářených, nespářených a o spáření se pokoušejících. Cílem bylo najít rozdílné látky mezi jedinci, které by mohly sloužit k chemické komunikaci při a po kopulaci.

Podstatným krokem při identifikaci a kvantifikaci biologického materiálu je volba vhodné analytické metody. V tomto případě jsou komunikační látky snadno zplynitelné a zároveň tepelně stabilní. Jde však o poměrně složitou matici vzorku.

Pro analýzu tohoto biologického materiálu byla používána metoda komprehenzivní dvoudimenzionální plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostním detektorem (GCxGC-TOF/MS). Jedná se o nedávno vyvinutou analytickou techniku, díky které je výrazně potlačen problém nežádoucího překrývání píků a zároveň je dosaženo vysoké citlivosti a selektivity<sup>6</sup>.

## 1.1 Cíl práce

Cílem diplomové práce byl vývoj metody na rozpoznání rozdílů mezi spářenými, nespářenými a o spáření se pokoušejícími jedinci čmeláků druhu *Bombus terrestris*.

Pokud by byly nalezeny rozdílné látky mezi spářenými a nespářenými jedinci, je pravděpodobné, že rozdílové složky slouží jako atraktanty. Tyto atraktanty mohou být syntetizovány a následně použity v umělých chovech pro jednodušší a efektivní kopulaci čmeláků.

Získání nových informací o složení sekretů a rozdílnosti mezi jedinci je rovněž zajímavé z biologického hlediska. Tyto informace nám mohou pomoci lépe porozumět a pochopit kopulační chování čmeláků *BT*.

Projekt zahrnuje:

### 1) Literární část – rešerše

- základní informace o čmelácích, páření, *Bombus terrestris*
- chemická komunikace, feromony, exokrinní žlázy
- analýza infochemikálií
- základní informace o GCxGC, instrumentace, porovnání GCxGC oproti GC
- hmotnostní detektor s průletovým analyzátozem, derivatizace DMDS

### 2) Experimentální část

- zpracování biologického materiálu, výběr vhodného rozpouštědla
- analýza kutikulárních oplachů pomocí GCxGC-TOF/MS
- stanovení uhlovodíků a rozdílných látek, DMDS
- zpracování dat, statistické vyhodnocení

### 3) Vyhodnocení

- určení vhodného rozpouštědla
- grafické znázornění množství uhlovodíků a rozdílných látek mezi jedinci
- určení polohy dvojné vazby

## 2 Teoretická část

### 2.1 Základní informace o čmelácích

Čmeláci patří do skupiny blanokřídleho hmyzu, do rozsáhlé nadčeledi Apidae s primitivnější sociální organizací<sup>7</sup>. Jedná se o jedny z nejdůležitějších opylovačů mnoha zemědělských i divoce rostoucích rostlin v celém mírném pásmu severní polokoule<sup>8</sup>. Čmeláci mají speciálně vyvinuté ústní ústrojí s dlouhým sosákem a díky tomu jsou nepostradatelnými opylovači rostlin, které mají tyčinky hodně hluboko mezi okvětními lístky (např. jetel, náprstník...). Včely se těmto rostlinám vyhýbají, jelikož nemají dostatečně dlouhý sosák pro jejich opylování<sup>2</sup>.

V posledních desetiletích došlo k velkému úbytku čmeláků, který nastal především kvůli likvidaci mezí, remízků a vypalování stařiny. Celkově je úbytek opylovačů za posledních 50 let výsledkem změny krajiny a intenzifikace zemědělské výroby<sup>8</sup>. Čmeláci totiž reagují velmi citlivě na změny vnějšího prostředí a mnozí z nich již patří mezi ohrožené druhy<sup>9</sup>.

Čmeláci jsou velmi důležitým modelovým organismem, který se využívá pro studium vztahů v ekosystémech, mechanismu vzniku a vývoje sociální hierarchie.

Čmeláčí společenství je zakládáno samotnou matkou, a téměř po celou dobu své existence jej tvoří pouze matka a podřízené dělnice<sup>9</sup>. Teprve z dostatečně rozrostlého hnízda se později v letních měsících rodí pohlavní jedinci – samci a mladé královny<sup>2</sup>. Samci brzy opouštějí rodné hnízdo a vydávají se hledat mladé královny, se kterými se následně spáří. Samci se shromažďují na květech, volně se mísí s dělnicemi. Na rozdíl od dělnic, samci nesbírají pyl do zásoby pro hnízdo, ale pouze pro svou potřebu<sup>10</sup>.

#### 2.1.1 Páření

Samci většinou opouštějí hnízdo již pár dní po svém vylíhnutí z kokonů. Po opuštění hnízda se už nevracejí a přespávají venku na vegetaci. Dále se soustřeďují především na hledání mladé královny, se kterou by se mohli spářit. K páření dochází v létě a na začátku podzimu. Samec se může spářit opakovaně, ale královna většinou jen jednou<sup>7,10</sup>.

Rozlišujeme tři hlavní typy předkopulačního chování samců<sup>11</sup>:

### *1) Patrolování*

Jde o nejčastější typ námluv mezi čmeláky. Při patrolování samečci létají po předem vyznačených cestách. Tyto cesty si značkují sekretem z hlavové (cefalické) části labiální žlázy<sup>12</sup>. Můžeme rozlišit dva základní typy patrolování<sup>10,13</sup>:

a) pravidelné patrolující lety, obvykle na otevřených prostorech, ale se snadným přístupem k hnízdu

b) pravidelné patrolující lety vzdálené od hnízda<sup>14,15</sup>.

Patrolování závisí na povětrnostních podmínkách. Značky působí jako atraktanty pro samičku a zároveň jako arestanty, tudíž by měly zdržet královnu do příletu samce. Samci vytvářejí jednotlivá zastávková místa, která jsou vzájemně vzdálena v rozmezí jednotek až desítek metrů. V jednom biotopu může patrolovat i několik druhů čmeláků a často se jejich letové dráhy kříží<sup>16</sup>. Svá území si samci značkují v dopoledních hodinách a během dne se postupně ke svým značkám vracejí a kontrolují, zda u nich není přítomna královna, která může být touto značkou přilákána<sup>11</sup>.

### *2) Číhání*

Čmeláci sedí na vyvýšeném místě (pozorovatelně) a vzlétnou za každým pohybujícím se objektem v domněnku, že jde o královnu<sup>15</sup>. Samci, kteří využívají této předkopulační techniky, mají ve srovnání s ostatními druhy enormně vyvinuté oči<sup>7</sup>. Číhání a vizuální hledání královen však není jejich jedinou předkopulační technikou, jak bylo dříve předpokládáno. Tito samci mají normálně vyvinutou labiální žlázu a jejím sekretem si značkují své pozorovatelné, na kterých vyčkávají a číhají na královny<sup>15,17</sup>.

### *3) Vyčkávání před hnízdem*

V období rozmnožování se samci shromažďují u vchodů do hnízd a čekají na výlet panenských královen. Samci se k sobě vzájemně chovají agresivně a snaží se zajistit si nejlepší pozici před hnízdem<sup>19</sup>. Po výletu panenské královny se na ni slétne shluk samců. Královna sama si vybere nejsilnějšího jedince. K vlastní kopulaci dochází v ústraní od hnízda<sup>7,15</sup>. Tyto druhy také mají funkční labiální žlázu. Pravděpodobně značkují určitá území svými sekrety, ale preferují vyčkávání na královny před hnízdem<sup>19</sup>.

## **Kopulace**

Během kopulace samci přenášejí do samičky kromě spermatu také lepkavou hmotu, která snižuje schopnost královny spářit se opakovaně. Chemickou analýzou bylo zjištěno, že se v ní vyskytuje specifický dipeptid – cyklopropylprolin, který dosud nebyl nalezen nikde jinde u hmyzu. Dále byla nalezena směs mastných kyselin – olejová, linolová, palmitová a stearová<sup>14</sup>.

Po spáření již královna nevyhledává další samce. Bylo zjištěno, že kyselina linolová snižuje atraktivitu královny. Lepkává hmota zůstává v královnách ještě cca 3 dny po oplození. Oplozené královny stráví zimu v hibernaci a další rok zakládají nové kolonie<sup>14</sup>.

### **2.1.2 *Bombus terrestris***

*Bombus terrestris* (BT), neboli čmelák zemní, patří mezi laboratorně chované a komerčně prodávané opylovače. Má ochmýřené tělo s typickými černými, bílými a žlutými pruhy. Jde o jeden z nejlépe prostudovaných druhů čmeláků<sup>3</sup>. BT patří mezi nejhojnější druhy a je schopný obývat nejrůznější prostředí. Vyskytuje se na celém území naší republiky i velké části Evropy. Díky komerčním chovům se dostává i do oblastí mimo svůj přirozený areál výskytu. V České republice patří mezi chráněné druhy<sup>8,9</sup>.

BT žije obvykle ve velkých koloniích. Tvoří stabilní sociální struktury s dominantní královnou a dělnicemi, které mají přesně vymezenou dělbu práce. Dominance královny BT je podmíněna především hormonálně<sup>20</sup>.

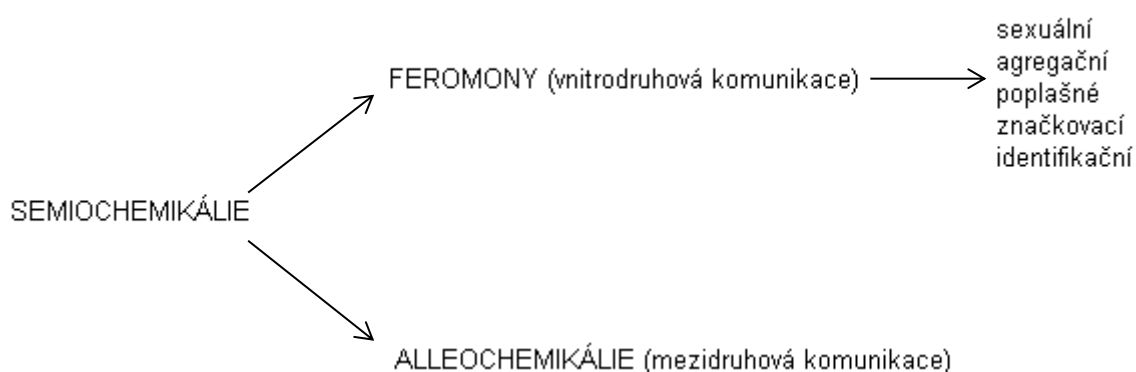
Typické předkopulační chování u samců BT je patrolování. Samci nanášejí své značky nízko nad povrchem půdy, převážně na bylinném a keřovém patře vegetace. Panenské královny jsou nalákány těkavými složkami samčího feromonu<sup>2</sup>.



Obr. 1: *Bombus terrestris* (C. Linneaus, 1758), Autor: Josef Hromek (2006)

## 2.2 Chemická komunikace

Chemická komunikace je hlavním dorozumívacím nástrojem a způsobem přenosu informace u hmyzu, především sociálního. U sociálního hmyzu bylo nalezeno přes 60 různých typů žláz, které produkují biologicky aktivní látky<sup>12</sup>. Při chemické komunikaci hrají hlavní roli látky zvané semiochemikálie, které organismus vylučuje nebo rozpoznává. Pokud zprostředkovávají přenos informace mezi druhy, nazývají se alleochemikálie. Při vnitrodruhovém přenosu jsou semiochemikálie nazývány feromony.



Obr. 2: Dělení semiochemikálií

### 2.2.1. Feromony

Feromony jsou jednoznačně nejdůležitějším typem semiochemikálií. Jde o látky vylučované exokrinní žlázou jedince do vnějšího prostředí, kde jsou přijímány jedincem téhož druhu, u něhož vyvolají určitou změnu chování<sup>7</sup>. Podle funkce dělíme feromony na několik základních typů – sexuální, agregační, poplašné, teritoriální, značkovací, stopovací a identifikační<sup>3,12</sup> (Obr. 2).

Z hlediska chemické struktury jsou feromony množinou často i naprosto nespojitých strukturních typů (alifatické nenasyčené látky, heterocykly, makrocycly, spiroacetyly, terpeny, aromatické látky apod.)<sup>12</sup>. Velmi podstatná je také stereochemie těchto sloučenin. Opačná konfigurace vazeb, enantiomery či různé polohové izomery u jinak podobných látek mohou vyvolat naprosto odlišnou biologickou odezvu<sup>21</sup>.

## 2.3 Exokrinní žlázy

Exokrinní žlázy jsou při výzkumu chemické komunikace hlavním předmětem zájmu, jelikož produkují sekrety, které obsahují biologicky aktivní látky. Mechanismus, který reguluje vypouštění sekretu ze žláz, není příliš dobře známý<sup>3</sup>. Znalost složení sekretu jednotlivých exokrinních žláz nám může pomoci k lepšímu pochopení a porozumění vnitrodruhovým a mezidruhovým vztahům živých organismů. Hlavní sociální funkce exokrinních žláz je produkce feromonů. Objevení nových látek je zajímavé také z medicínálního hlediska<sup>12</sup>.

### Význam uhlovodíků

Uhlovodíky hrají významnou roli u exokrinní sekrece hmyzu. Kutikulární uhlovodíky mohou sloužit jako rozpouštědlo a udržovat kontrolu nad vypařováním a oxidací sekretu jednotlivých žláz<sup>22</sup>. Vytvářejí složky směsí sexuálních feromonů u většiny dvoukřídlých<sup>3</sup>. Ačkoliv jsou uhlovodíky velmi hojně zastoupeny u blanokřídlých, je potřeba dalších výzkumů pro zjištění, zda jsou podstatné v chemické komunikaci čmeláků<sup>13</sup>.

### Žlázové sekrety u *BT*

Analýzou složek hlavních exokrinních žláz u *BT* byly zjištěny 3 významné skupiny látek, které mohou hrát roli v rámci komunikace – uhlovodíky, terpeny a mastné kyseliny a jejich estery. V žlázových extraktech dominují uhlovodíky s lichým počtem uhlíků, především C23, C25, C27, C29 a C31<sup>3</sup>. V rámci kyselin nalezených u *BT* jsou nejhojněji zastoupeny myristová, palmitová a stearová. V extraktech nelze opomenout voskové estery, které jsou téměř všudypřítomné a pozoruhodně složité. Tyto vlastnosti nás vedou k předpokladu, že voskové estery mají komunikační funkci<sup>4</sup>.

### 2.3.1 Labiální žláza

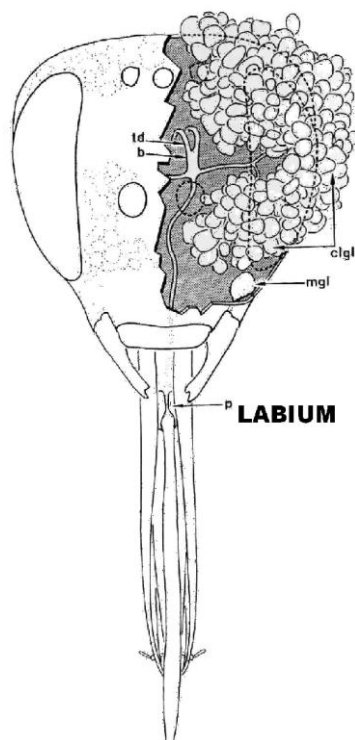
Značkovací feromon je produkován hlavovou (cefalickou) částí labiální žlázy (Obr. 3) samců<sup>10</sup>. Cefalická část labiální žlázy je největší a nejdůležitější samčí exokrinní orgán. Je složen ze stovek váčků (acinů) se sekrečními buňkami, které produkují poměrně velké množství sekretu<sup>23</sup>.

Dle rozdílného složení sekretu labiální žlázy je možné rozlišit jednotlivé druhy samců<sup>2,24</sup>. Dokonce i druhy, které si jsou morfologicky velmi blízké, se v rámci



chemického složení značkovacího feromonu často výrazně liší. Jde tedy o mezidruhově specifické složení, které je využíváno k taxonomické identifikaci<sup>10</sup>.

Při značkování vypouští samec z oblasti labia směs chemických sloučenin. Tímto si udržuje po delší dobu své značené teritorium, které pravidelně navštěvuje během pářicího období. Vylučovaný sekret není příliš těkavý, tudíž může být atraktivní pro královnu i po několika hodinách od označení<sup>4,19</sup>. Královna se zdrží do přiletu samečka a následně dochází ke kopulaci<sup>12</sup>.



Obr. 3: Labiální žláza<sup>18</sup>

#### Chemické složení sekretu labiální žlázy:

Jako první biologicky aktivní látka v labiální žláze byl identifikován 2,3-dihydrofarnesol u *BT*<sup>12</sup>. Je to látka vyskytující se v citrusových květech, která může být identifikována i lidským čichem<sup>10</sup>. Mezi hlavní složky labiální žlázy u *BT* dále patří ethyl-dodekanoát, hexadekan-1-ol, oktadeka-9,12,15-trien-1-ol a geranylcitronellol<sup>23</sup>.

U většiny druhů čmeláků byly nalezeny látky izoprenoidní povahy. Jedná se o monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny, které se nacházejí vždy v oxidované formě jako alkoholy a jejich estery nebo aldehydy. V rámci zastoupení terpenických látek se nejčastěji vyskytují citronellol, dihydrofarnesol a geranyl-citronellol. Dále se v labiální žláze

vyskytují rovněž alifatické alkoholy, aldehydy, estery mastných kyselin, nasycené a nenasycené uhlovodíky s délkou řetězce 21-27 atomů uhlíku<sup>7,12,19</sup>.

Množství sloučenin v sekretu labiální žlázy se výrazně mění během života samečka. Koncentrace látek dosáhne maxima během 7 dní po zrození a následně nastává rapidní pokles množství látek. Samci *BT* mají největší množství sekretu ve věku 4-7 dní<sup>23,24</sup>.

### 2.3.2 Mandibulární žláza

Mandibulární žláza může zastávat v kolonii čmeláků několik funkcí:

#### *a) Zdroj sexuálního feromonu*

U panenské královny slouží extrakt z mandibulární žlázy jako zdroj sexuálního feromonu, který vyvolává u samečků kopulační chování<sup>2</sup>. Sekret je produkovaný z mandibulární žlázy a dostává se na kutikulu královny<sup>25</sup>.

#### *b) Zdroj mateří tlumící látky*

V kolonii čmeláku si královna udržuje svou dominanci v hnízdě pomocí mandibulární žlázy. Ze žlázy je produkován extrakt, který inhibuje produkci juvenilního hormonu u dělnic, takže u nich nedochází k vývinu vaječníků<sup>26</sup>. Nicméně i královny bez mandibulární žlázy byly schopny do určité míry inhibovat vývin vaječníků u dělnic. Lze tedy předpokládat, že královna si udržuje v hnízdě svou dominanci nejen pomocí mandibulární žlázy, ale i svým chováním. Zároveň zde však mohou figurovat další feromony, které z této žlázy nepochází<sup>3</sup>. Látky nalezené v extraktu mandibulární žlázy byly identifikovány i na povrchu těl dělnic. Je tedy pravděpodobné, že královna nanáší feromon na těla dělnic<sup>26</sup>. Bylo zpochybněno, že feromon způsobující inhibici reprodukce dělnic pochází z mandibulární žlázy královen. Je možné, že královna využívá pro inhibici juvenilního hormonu dělnic feromonu, který se vyskytuje na její kutikule<sup>27</sup>.

#### *c) Produkce obranných látek*

V případě ohrožení čmeláci vylučují z mandibulární žlázy obranný sekret. Hlavní složkou je kyselina máselná<sup>2</sup>.

Chemickou analýzou sekretu mandibulární žlázy bylo identifikováno kolem 500 látek alifatické povahy. Hlavními složkami jsou polární látky s karboxylovou skupinou: kyseliny 3-hydroxydekanová, 9-oktadecenová a oktadekanová<sup>2</sup>.

### 2.3.3 Tarsální žláza

Dlouhou dobu se předpokládalo, že sekret tarsální žlázy, která je umístěna v chodidle čmeláků, slouží k označení zdroje potravy. Poslední studie však prokázaly, že tarsální žláza nemá žádný otvor pro sekreci<sup>28</sup>. Produkovaný sekret se hromadí uvnitř žlázy v rezervoáru a může být rozšířen mezi drápky až k aroliu (tzv. podložkový orgán). Je tedy pravděpodobné, že slouží k naplnění a správnému rozložení arolia při chůzi. Díky tomuto jevu dochází ke zvýšení přilnavosti chodidel na hladké povrchy, jak je již známo u včel a mravenců<sup>29</sup>.

Analýzou sloučenin tarsální žlázy u *BT* byl identifikován komplex uhlovodíků s lichým počtem uhlíkových atomů v řetězci. Především byly nalezeny alkany, alkeny a jejich izomery<sup>30,31</sup>. Alkeny měly dvojnou vazbu v polohách 7, 9 a 11. Nejčastěji se v sekretu vyskytovaly tyto uhlovodíky: trikosan, pentakosan, heptakosan a nonakosan<sup>8,30,32</sup>.

### 2.3.4 Tendonová žláza

Tendonová žláza je nově objevenou exokrinní žlázou u čmeláků. Je umístěna ve větší části nohy podél šlachy. Na rozdíl od tarsální žlázy obsahuje otvor pro sekreci. Sekret tendonové žlázy obsahuje především nepolární látky – nasycené a nenasycené uhlovodíky a voskové estery. Složení sekretu u samců *BT* se výrazně liší od sekretu dělnic a královen. Samci produkují větší množství voskových esterů a naopak jim chybí určité uhlovodíky. Dvojná vazba v nenasycených uhlovodících C27= a C29= se u samců vyskytuje nejčastěji v poloze 9. U královen byla vazba v různých polohách, v rozmezí 8-13. Tyto chemické rozdíly v zastoupení látek u samců vedou k závěru, že samčí specifické látky hrají určitou roli v kopulačním chování *BT*. Samci *BT* se otírají nohama o tělo královny během kopulace, čímž může docházet k přenosu sekretu z tendonové žlázy na povrch královny<sup>28</sup>.

### 2.3.5 Dufourova žláza

Sekret Dufourovy žlázy slouží především ke komunikaci spojené s chováním v hnízdě, rozpoznání mateřského hnízda a orientací uvnitř hnízda<sup>26</sup>. Dělnice si vyznačí cestu od vchodu hnízda až k plodovým buňkám a jsou schopny tuto cestu sledovat. Stopa je dobře čitelná i po delší době<sup>2</sup>.

Analýzou sekretu Dufourovy žlázy byly identifikovány druhově specifické látky. V sekretu dominovaly především uhlovodíky s nevětvenými řetězci, počínaje henikosanem a hentriakontanem konče<sup>3</sup>.

V sekretu Dufourovy žlázy u *BT* byly nalezeny hlavně estery, karboxylové kyseliny a komplex uhlovodíků. Pouze u *BT* byly identifikovány: farnesyl-hexanoát a geranyl-citronello<sup>4</sup>. Uhlovodíky dominují při analýzách sekretu této žlázy a vyskytují se nejčastěji v podobě pentakosanu, heptakosanu a nonakosanu. Dvojně vazby u uhlovodíků se vyskytovaly v polohách 5 a 15<sup>3,4</sup>.

### Kutikula x Dufourova žláza

Při porovnání několika druhů čmeláků bylo zjištěno, že uhlovodíky nalezené v kutikulárním oplachu jsou shodné s uhlovodíky v sekretu Dufourovy žlázy<sup>3</sup>. Složení kutikulárních uhlovodíků nalezených na povrchu těla dělnic je velmi podobné složení uhlovodíků v Dufourově žláze pravděpodobně proto, že sekret produkovaný žlázou přichází do kontaktu s kutikulou hmyzu<sup>2,22</sup>.

Kutikulární vosky u sociálního hmyzu hrají roli v druhovém a individuálním rozpoznávání. Při analýze sekretu byly nalezeny uhlovodíky v rozmezí C19-C31, estery, karboxylové kyseliny. Uhlovodíky na povrchu kutikuly pocházejí nejspíše z malých epidermálních žláz, které vypouštějí sekrety skrz kutikulární póry<sup>22</sup>.

## **2.4 Analýza infochemikálií**

Aktivní sloučeniny v chemických signálech hmyzu lze izolovat a identifikovat za použití rozličných interdisciplinárních přístupů, které zahrnují etologii hmyzu, analytickou a organickou chemii, biochemii a ekologii. V posledních letech došlo k velkému rozvoji instrumentálních metod v analytické chemii. Nové techniky a přístupy nám umožňují provést podrobnou a rychlou analýzu i relativně malého množství biologického materiálu.

Nejprve je potřeba získaný biologický materiál vhodně izolovat. Pro izolaci feromonů je vhodná extrakce rozpouštědlem celého těla nebo pouze žlázy, která produkuje danou aktivní látku. Používají se lipofilní rozpouštědla typu diethylether, chloroform a n-hexan<sup>33</sup>.

Pro analýzu semiochemikálií se nejvíce používají chromatografické metody typu plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, komprehenzivní dvoudimenzionální chromatografie s průletovým hmotnostním analyzátozem, vysokoúčinná kapalinová

chromatografie a mnohé další<sup>34</sup>. Výběr vhodných metod se řídí také dostupným množstvím biologického materiálu, který chceme analyzovat. Hlavním problémem bývá malé množství žádaného biologického materiálu a složitá matrice vzorku<sup>35</sup>.

Vhodnou chromatografickou metodou pro tyto účely je proto komprehenzivní dvoudimenzionální plynová chromatografie s hmotnostní detekcí GCxGC-TOF/MS. Tato metoda poskytuje citlivou a selektivní separaci s vysokou píkovou kapacitou. Výsledkem jsou uspořádané strukturované chromatogramy, díky kterým je možná jednodušší a spolehlivější identifikace analytu<sup>36</sup>.

Z chromatogramu odečteme hmotnostní spektrum žádané látky. Z hmotnostního spektra získáváme informaci o molekulové hmotnosti a typu sloučeniny. Dalším krokem pro objasnění struktury molekuly je určení polohy a konfigurace dvojných vazeb v nenasycených látkách. Poloha dvojných vazeb se určuje pomocí nejrozličnějších derivatizačních technik (např. přípravou aduktu s dimethyldisulfidem<sup>2</sup>, ozonolýzou nebo chemickou ionizací pomocí acetonitrilu v iontové pasti)<sup>37,38</sup>.

#### **2.4.1 Základní informace o komprehenzivní dvoudimenzionální plynové chromatografii (GCxGC)**

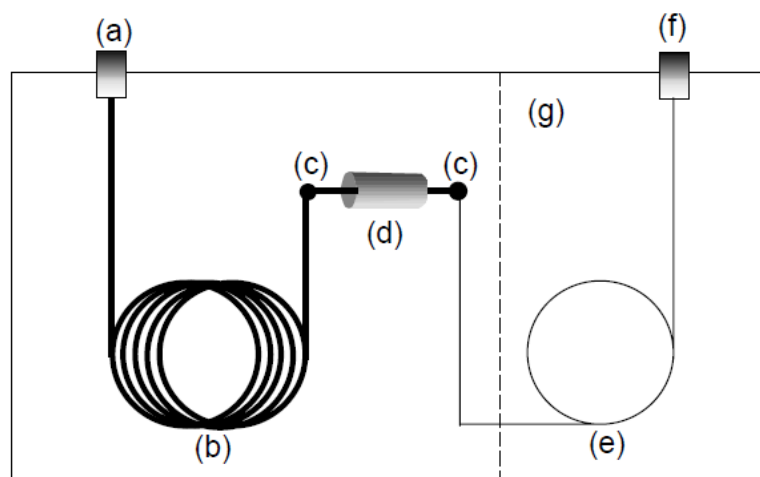
##### Historie

Moderní plynovou chromatografii představili Martin a James již v roce 1952. Tato metoda se postupně stala jednou z nejdůležitějších a nejčastěji využívaných analytických technik<sup>39</sup>. Dnešní doba však vyžaduje analýzy složitých komplexních vzorků s více než 150 až 250 významnými látkami. Pro tento typ analýz již není dostačující klasická jednodimenzionální plynová chromatografie (GC)<sup>40</sup>.

Významným mezníkem ve vývoji GC bylo představení inertních křemenných kapilárních kolon na konci 70. let. GC se začala mnohem více využívat pro analýzy složitějších vzorků přírodních materiálů. Vývoj nízkonákladových a účinných hmotnostních spektrometrů, ve spojení s plynovou chromatografií, vedl k dalšímu pokroku<sup>39</sup>. Skutečný průlom v oblasti separace látek v plynné fázi nastal až v roce 1991, kdy Philips a spol. představili zcela novou formu 2D GC, nazývanou komprehenzivní dvoudimenzionální plynová chromatografie (GCxGC)<sup>41</sup>.

### Obecné informace

GCxGC (Obr. 4) poskytuje účinnou separaci kombinovanou s velmi vysokou píkovou kapacitou. Separace probíhá na dvou různých kolonách s rozdílnou selektivitou, které jsou propojeny přenosovým systémem – modulátorem<sup>42</sup>. Látky se dělí pomocí dvou vzájemně nezávislých separačních kroků a pak pokračují do detektoru. Separace pomocí dvou dimenzí je proto výrazně účinnější než v jedné<sup>43</sup>.



Obr. 4: Koncepční diagram GCxGC systému<sup>44</sup>.

(a) injektor, (b) primární kolona, (c) spojení kolon, (d) modulátor, (e) sekundární kolona, (f) detektor, (g) pec sekundární kolony

### Základní princip

Nejprve dochází k dávkování vzorku do kolony. Je důležité reprodukovatelně a rychle převést kapalný vzorek do plynné fáze beze změny jeho relativního složení. V tomto experimentu se využívalo dvou způsobů dávkování – s děličem toku (split) a bez děliče toku (splitless).

Při dávkování split je celý objem vzorku přenesen stříkačkou přes septum do lineru. Pouze část objemu vzorku je zavedena do kolony. Dělicí poměr udává, jaká část vzorku je zavedena do kolony. Zbylá část objemu vzorku odchází děličem do atmosféry. Dávkování split se využívá pro relativně koncentrované vzorky, za vzniku velmi ostrých zón vzorku na koloně<sup>43</sup>.

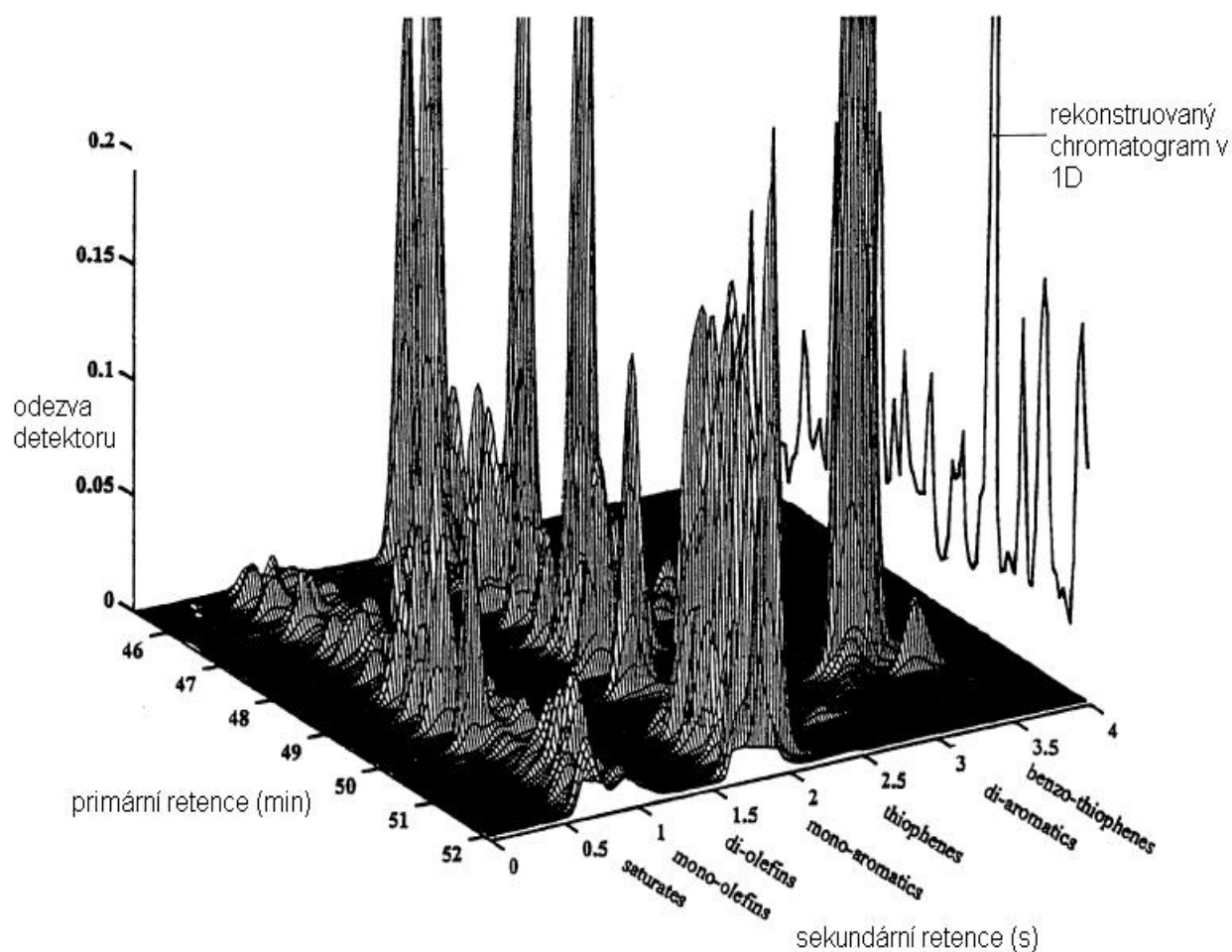
Při dávkování splitless je opět celý objem vzorku přenesen stříkačkou přes septum do lineru, ale zde na rozdíl od split modu je celý objem zaveden do kolony. Splitless mod se využívá pro velmi zředěné vzorky a stopové analýzy<sup>45</sup>.

Analyt je nejprve separován na primární kapilární koloně s vysokým rozlišením<sup>42</sup>. Primární kolona obsahuje nejčastěji nepolární stacionární fázi, kde se látky dělí podle teploty varu, převážně se zde tedy uplatňují disperzní interakce<sup>43,46</sup>. Části efluentu z primární kolony (první dimenze = 1D) jsou poté v pravidelném intervalu přenášeny pomocí modulátoru do sekundární kolony (druhá dimenze = 2D), kde dochází k velmi rychlému dělení<sup>45,47</sup>. Jde o vzájemně se doplňující separační systémy<sup>43</sup>.

Separace na sekundární koloně poskytuje dílčí vzorky, které jsou relativně jednoduché a obsahují látky s podobnou teplotou varu. Sekundární kolona je kratší a užší, aby mohla poskytovat velmi rychlou separaci, která v podstatě probíhá za izotermálních podmínek<sup>42</sup>. Sekundární kolona obsahuje nejčastěji polární stacionární fázi, kde se látky dělí podle své polarity<sup>46</sup>. Zde se uplatňují jak nepolární (disperzní), tak i polární (specifické) interakce. Se vzrůstající teplotou klesá podíl disperzních interakcí a uplatňují se zde spíše specifické polární interakce. Sekundární kolona je proto většinou zahřívána na vyšší teplotu než primární kolona.

Pro detekci výsledného signálu je podstatné mít detektor s dostatečně vysokou vzorkovací frekvencí, protože píky produkované krátkou sekundární kolonou jsou velmi úzké (řádově desítky milisekund). Nejčastěji jsou využívány detektory typu - plamenový ionizační detektor (FID) a hmotnostní detektor s průletovým analyzátozem (TOF)<sup>48</sup>.

GCxGC chromatogramy jsou strukturované (Obr. 5) a analyty jsou seřazeny podle charakteristických skupin. Pík v první dimenzi se skládá z několika píků druhé dimenze, tzv. modulací (Obr. 6). Při kvantifikaci signálu se počítá součet integrálů jednotlivých modulací, které jsou součástí téhož analytu<sup>49</sup>.



Obr. 5: Chromatogram GCxGC ve 3D, ukázka části chromatogramu při separaci těžších ropných frakcí po krakování<sup>42</sup>

### Využití GCxGC

Metoda GCxGC nachází uplatnění hlavně při analýze komplexních vzorků, jako jsou frakce ropy a environmentální vzorky<sup>50,51,52</sup> (Obr. 5). GCxGC je vhodnou separační metodou využívanou dále i v biochemii, farmacii, soudní chemii, kontrole potravin, sledování ovzduší...<sup>48,53</sup>. Kromě toho, že metoda GCxGC je vhodná pro separaci složitějších směsí, je možné ji využít pro rychlé prověření relativně jednoduchých směsí<sup>54</sup>.



### 2.4.1.1 Instrumentace

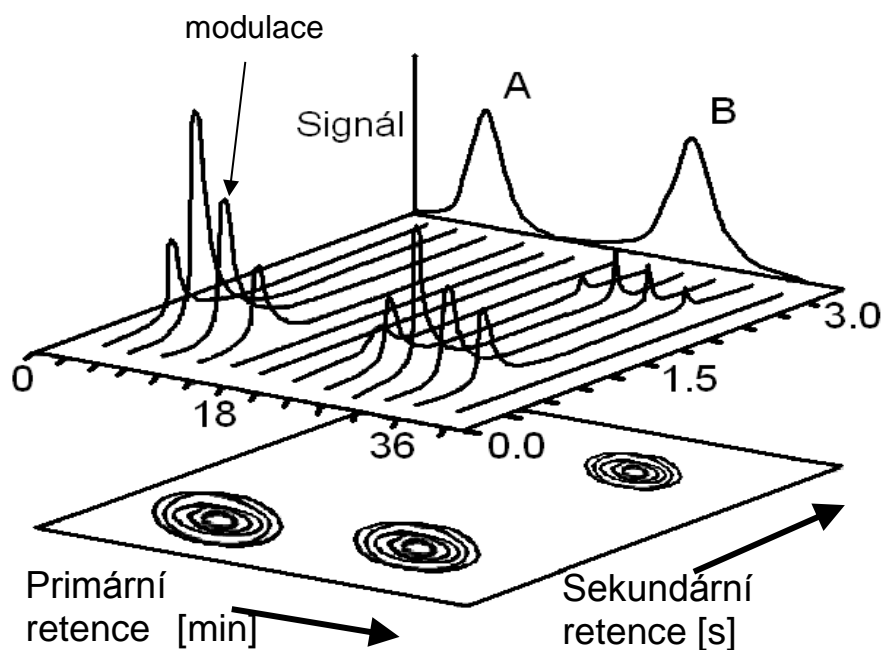
#### Modulace

Při separaci pomocí GCxGC je eluent z primární kolony rozdělen do velkého množství menších frakcí, z nichž každá je následně dělena na sekundární koloně. Dělení na sekundární koloně je výrazně rychlejší oproti dělení na primární koloně.

Nezbytným zařízením, které umožňuje přenos frakcí z primární kolony do sekundární, je modulátorové rozhraní mezi dvěma kolonami<sup>45</sup>. Pokud by eluent z primární kolony přecházel rovnou do sekundární kolony, získali bychom pouze 1D separaci se smíšeným rozdělením. V GCxGC jsou používány různé typy termálních modulátorů. Mezi nejpoužívanější modulátory patří ventilový, termální a kryogenní<sup>43</sup>.

Při tvorbě 2D chromatogramu jsou ovládacím programem naskládány jednotlivé analýzy ze sekundární kolony (tzv. modulace) vedle sebe podle doby, kdy jednotlivé složky injektované směsi opouštěly primární kolonu<sup>45</sup>. Konstrukce chromatogramu je zobrazena na obrázku 6. Na tomto schématu je vidět, proč má rekonstruovaný dvoudimenzionální chromatogram v 1D (primární retenci) horší rozlišení - pík je vykreslen softwarem z malého počtu bodů (v případě zobrazené látky A ze 4 bodů).

Komprehenzivní dvoudimenzionální chromatografie poskytuje výrazné zvětšení separačního prostoru a tím i lepší přehlednost výsledného chromatogramu (Výsledky a diskuze, Obr 10). Tímto je usnadněna identifikace analytů (např. jednoduché rozlišení homologů s různými funkčními skupinami)<sup>45</sup>.



Obr. 6: Konstrukce 3D chromatogramu

## Kolony

Primární kolony jsou v průměru dlouhé 15-30 m s vnitřním průměrem 0,25 mm. Obsahují vrstvu nepolární fáze tvořenou polydimethylsiloxany nebo methylfenylsiloxany<sup>44</sup>. Po separaci na primární koloně vznikají relativně široké píky<sup>43</sup>.

Separace na sekundární koloně musí proběhnout velmi rychle, aby nedošlo ke ztrátě separace získané na primární koloně. Dále se využívají kolony s odlišnou stacionární fází, aby se uplatnil jiný separační mechanismus oproti primární koloně. Typicky jsou používány 50/50 fenyl/methyl stacionární fáze. Sekundární kolony jsou dlouhé 0,5-1 m s vnitřním průměrem 0,1 mm<sup>44</sup>. GCxGC využívá v druhé dimenzi úzkých tubulárních kolon pro získání co nejvyššího rozlišení za krátký časový úsek<sup>42</sup>.

## Detektory

Detektory pro GCxGC musí mít dostatečnou skenovací rychlost, aby byly schopné analyzovat úzké píky produkované sekundární kolonou<sup>44</sup>. Dosud byly používány převážně plamenové ionizační detektory (FID). Výrazné zvýšení identifikační schopnosti se dosáhne připojením hmotnostního spektrometru. MS je velmi často využíván v GCxGC, jelikož může pracovat v univerzálním detekčním modu (podobný plamenovému ionizačnímu detektoru (FID)) a ve specifickém iontovém modu<sup>48</sup>. V současné době patří mezi nejčastěji využívané detektory MS s průletovým hmotnostním analyzátozem „Time of flight“ (TOF), který je schopný skenovat s velmi vysokou rychlostí, což znamená dosažení většího množství spekter na chromatografický pík<sup>54</sup>. V tomto experimentu byl využit TOF s elektronovou ionizací (EI), kdy dochází k ionizaci plynu proudem elektronů. Analyty jsou tedy ionizovány elektrony o energii 70 eV. Ionty analyzované látky jsou následně urychleny silným elektrickým polem ( $\approx 25$  kV) a je jim udělena stejná energie. Získaná kinetická energie je přímo úměrná náboji iontů a nepřímo úměrná jejich hmotnosti<sup>55</sup>. Výsledkem je rozdílná rychlost iontů s různým poměrem  $m/z$ . Při uražení stejné vzdálenosti urychlené ionty dopadnou na detektor v rozdílném čase. U částic se stejným nábojem bude tedy jejich rychlost záviset pouze na jejich hmotnosti<sup>56</sup>. Je zřejmé, že k rozdělení iontů dochází na základě jejich odlišné doby letu. Ionty s nižší hmotností mají větší rychlost a dopadají na detektor dříve, těžší ionty dorazí na detektor později<sup>55</sup>. Ze znalosti doby letu částice a experimentálních parametrů je možné určit poměr molekulové hmotnosti náboje iontu<sup>57</sup>.

#### 2.4.1.2 Porovnání GCxGC s GC

Kvantifikace množství vzorku ve 2D je v základním principu velmi podobné jako v 1D GC. Daná substance projde sérií chromatografických kolon, až dosáhne detektoru a tím vyvolá přiměřený signál<sup>49</sup>. Identifikace jednotlivých složek vzorku pomocí GCxGC je však oproti 1D spolehlivější, protože separace ve dvou dimenzích jsou více strukturované, což umožňuje snadnější identifikaci složitějších směsí<sup>40</sup>.

Hlavní omezení 1D GC je nedostatečná separace a citlivost při stanovení složek u komplexních vzorků, chybná či nemožná identifikace analytu a špatné vyhodnocení výsledků (nadhodnocení či podhodnocení). Nejvýznamnější výhody GCxGC jsou tedy zvýšení píkové kapacity, zlepšení citlivosti a tvorba strukturovaného chromatogramu<sup>43</sup>.

##### a) Píková kapacita

Jde o maximální množství komponentů umístěných v daném rozlišení vedle sebe v chromatogramu<sup>48</sup>. Omezení píkové kapacity v 1D je zřejmé při separaci složitější směsi látek, kdy není možné dosáhnout dostatečné rozlišovací schopnosti<sup>56</sup>. Ve 2D separační prostor umožňuje výrazně účinnější separaci a je možné identifikovat více sousedních píků<sup>46,58</sup>.

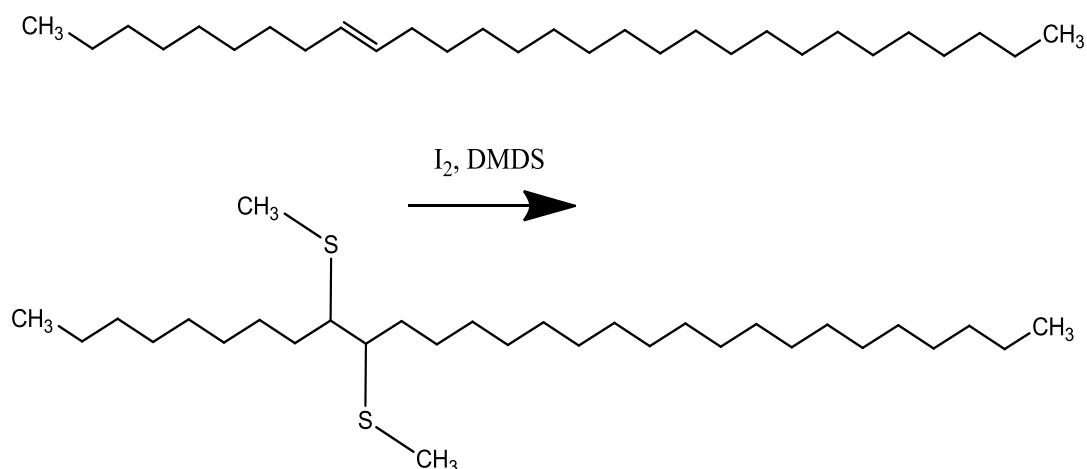
##### b) Zvýšení citlivosti

Stejné množství látky, které projde v 1D detektorem během několika sekund, projde skrz vysokorychlostní detektor po několika úzkých částech v rámci desítek ms. Píky jsou následně ostřejší a vykazují vyšší poměr signálu k šumu<sup>43</sup>. Zároveň dochází i k oddělení chemického šumu od analytů. Zvyšuje se citlivost metody<sup>59</sup>.

#### 2.4.3 Určení polohy dvojné vazby

Derivatizační technika je ucelená strategie přípravy analytu pro jeho analýzu instrumentální analytickou technikou. V tomto případě dochází k derivatizaci analytu pomocí dimethyldisulfidu (DMDS). Doposud bylo využito této derivatizace u mnohých sloučenin, jako jsou např. nevětvené alkeny, voskové estery, nenasycené acetáty, mastné kyseliny a jejich estery<sup>38,60</sup>. Nejčastěji se však tato metoda používá k určení polohy dvojných vazeb u alifatických sloučenin s jednou dvojnou vazbou, čehož bylo využito i v tomto experimentu při určení polohy dvojné vazby u C27= a C29=.

Derivatizace s DMDS je jednoduchá, probíhá pouze v jediném kroku za katalýzy jódem (Obr. 7). Pro správný průběh reakce je nutné, aby probíhala bez přístupu světla<sup>38,61</sup>.



Obr. 7: Schéma derivatizace s DMDS pro C<sub>29</sub>=. Místo původní dvojné vazby jsou navázány methylsulfidové skupiny.

Při reakci s DMDS dochází k navázání methylsulfidových skupin (SCH<sub>3</sub>) na uhlíky, mezi kterými je  $\pi$ -vazba. Hmotnost fragmentu SCH<sub>3</sub> je 47. Molekulová hmotnost vzniklého aduktu je tudíž o 94 jednotek vyšší než původní nenasycená molekula. Při EI v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru následně dochází k rozštěpení vazby mezi uhlíky, na kterých jsou vázány SCH<sub>3</sub> substituenty. Vzniknou dva fragmenty, jejichž alifatické řetězce jsou zvětšené o 47 hmotnostních jednotek<sup>38</sup>.

Specifické fragmenty lze poté snadno identifikovat, jelikož mají v hmotnostním spektru intenzivní signály<sup>60</sup> (Experimentální část, Obr. 9). Díky těmto iontům je možné určit polohu dvojné vazby<sup>62</sup>.

## 2.5 Statistické zpracování dat

Výsledky byly zpracovány za předpokladu normality dat pomocí statistických testů typu F-test a T-test. Statistickými testy se prověřuje platnost nulové hypotézy. Na základě nich pak hypotézu přijmeme nebo zamítneme<sup>63</sup>.

### F-test

Testem je rozhodováno o významnosti shody dvou rozptylů ( $\sigma_1^2, \sigma_2^2$ ) pro určení, jestli jsou rozptyly v obou skupinách jedinců stejné. Celkový F-test testuje nulovou hypotézu ve tvaru  $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$  a alternativní hypotézu  $H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$  na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Předpokladem pro testování je  $s_1^2 > s_2^2$ , kdy  $s_1^2, s_2^2$  jsou směrodatné odchylky jednotlivých rozptylů. Vypočte se podíl  $\frac{s_1^2}{s_2^2}$  a porovná se s tabelovanou hodnotou F ve statistických

tabulkách pro danou skupinu vzorků<sup>61</sup>. Pokud je  $\frac{s_1^2}{s_2^2} < F$ , přijímá se nulová hypotéza o

shodě rozptylů  $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$  a je možné využít T-test pro shodné rozptyly. Pokud je

$\frac{s_1^2}{s_2^2} > F$ , přijímá se alternativní hypotéza, kdy rozptyly nejsou shodné  $H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$  a

následně se další testování provádí za použití T-testu pro různé rozptyly<sup>63,64</sup>.

### T-test

Testem je určována významnost rozdílu dvou výběrových průměrů.

#### *T-test pro shodné rozptyly*

Za předpokladu, že rozptyly se statisticky významně neliší  $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$  a počet stupňů volnosti je  $n+m-2$ , potřebujeme pro výpočet určit odhad rozptylu  $s_{xy}^2$  a kritický obor.

Výpočet odhadu rozptylu:

$$s_{xy}^2 = \frac{(n-1)s_x^2 + (m-1)s_y^2}{n+m-2} \quad (1)$$

$s_x^2, s_y^2$  ...směrodatné odchylky výběrů

$n, m$  .....počet jedinců v jednotlivých skupinách x a y

Odhad rozptylu se využije pro výpočet kritického oboru:

$$\frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{s_{xy}} \sqrt{\frac{nm}{n+m}} > p\text{-value} \quad (2)$$

Pokud kritický obor je větší než  $p$  hodnota (0.05), přijímáme hypotézu o shodě středních hodnot a naopak.

### *T-test pro různé rozptyly*

Za předpokladu, že rozptyly se statisticky významně liší -  $H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$ , využívá se testovacího kritéria  $T_2$  a stupňů volnosti  $\nu$ .

Vztah pro výpočet testovacího kritéria:

$$T_2 = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{\frac{s_x^2}{n} + \frac{s_y^2}{m}}} \quad (3)$$

Vztah pro výpočet stupňů volnosti:

$$\nu = \frac{\left( \frac{s_x^2}{n_1} + \frac{s_y^2}{n_2} \right)}{\frac{\frac{s_x^4}{n_1^2} (n_1 - 1) + \frac{s_y^4}{n_2^2} (n_2 - 1)}{2}} \quad (4)$$

Pokud je  $T_2 > \nu$ , zamítá se hypotéza  $H_0$  a střední hodnoty nejsou shodné<sup>64</sup>.

### **P-value**

Hodnota  $p$  je obvyklým výstupem počítačových programů na testování hypotéz. Udává mezní hladinu významnosti, při které bychom ještě hypotézu zamítali. Hypotéza  $H_0$  je zamítnuta na hladině významnosti  $\alpha$ , právě když  $p$ -hodnota je menší než  $\alpha$ <sup>63</sup>.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Biologický materiál

Pro výzkum a analýzu látek na povrchu těla čmeláků byl vybrán jako modelový organismus čmelák zemní - *Bombus terrestris*. Jde o jeden z nejlépe prostudovaných druhů čmeláků, u kterého je zvládnutá metodika chovu v laboratorních podmínkách<sup>24</sup>. Díky tomu bylo možné pracovat s jedinci o definovaném stáří. Čmeláci pocházeli z laboratorních chovů z Výzkumného ústavu pícninářského, spol. s.r.o. Troubsko. Pro experiment byly použity chovy založené v roce 2011 a 2012. Stáří čmeláků bylo v rozmezí 6-9 dní.

V experimentu bylo použito 48 čmeláků *Bombus terrestris*, z toho 29 královen a 19 samců. Jedinci byli rozděleni do definovaných skupin podle svého kopulačního chování. Dr. Hovorka (vědecký pracovník AVČR) na základě pozorování tohoto chování rozdělil jedince do skupin - spáření, nespáření a o spáření se pokoušející (Tab. 1).

Tab. 1: Souhrnný přehled

Charakteristika	Počet jedinců	
	Královny	Samci
Nespáření	9	7
Pokus o spáření	10	6
Spáření	10	6

#### Popis skupin:

##### Nespáření

Jedinci byli chováni izolovaně a nepřišli do styku s opačným pohlavím.

##### Spáření

U těchto jedinců proběhla kopulace s opačným pohlavím.

##### Pokoušející se o spáření

Jedinci se opakovaně snažili spářit s opačným pohlavím, ale bez úspěchu. Docházelo k úzkému styku a vzájemnému otírání mezi jedinci. Je zde tedy určitá možnost vzájemné kontaminace povrchu těl, ale ke kopulaci nedošlo.

## 3.2 Chemikálie

0,1% palmityl-palmitát roztok v hexanu (Nu-Chek-prep)

0,1% myristyl-oleát roztok v hexanu (Nu-Chek-prep)

0,1% palmityl-palmitoleát roztok v hexanu (Nu-Chek-prep)

1-bromoikosan (Sigma Aldrich)

Diethylether (Penta)

Dimethyldisulfid (Merck)

Hexan (Sigma Aldrich)

Chloroform (Penta)

Jod (Lachema-Chemapol)

Pentahydrát thiosíranu sodného (zásoby laboratoře)

## 3.3 Výběr vhodného rozpouštědla

Pro extrakci biologického materiálu se obvykle používají lipofilní rozpouštědla. V tomto experimentu šlo především o výtěžnost nepochlívání látek (uhlovodíky, terpenické látky a vosky) v kutikulárních extraktech jedinců. Účinnost extrakce byla testována na dvou různých nepochlívání rozpouštědlech – chloroformu a hexanu.

Pomocí těchto rozpouštědel byly připraveny kutikulární extrakty těl samců. Postup přípravy byl shodný s přípravou ostatních vzorků (viz. 3.4.1). Pro každé rozpouštědlo byla provedena tři opakování. Vzorky byly analyzovány pomocí GCxGC-TOF/MS (viz. 3.4.2). Ve vzorcích bylo určeno zastoupení uhlovodíků, terpenických látek a vosků (Graf 1, Graf 2). Na základě rozdílné výtěžnosti těchto látek bylo vybráno vhodné rozpouštědlo.

## 3.4 Analýza kutikulárních oplachů

Jako vhodné rozpouštědlo pro analýzu kutikulárních extraktů *BT* byl zvolen hexan. Následně byl zpracován celý biologický materiál (48 jedinců). Jejich extrakty byly analyzovány pomocí GCxGC-TOF/MS.



### **3.4.1 Příprava vzorků**

#### Příprava standardu

Bylo naváženo 19,5 mg 1-bromoikosanu a následně rozpuštěno ve 2 mL hexanu. Výsledná koncentrace standardu byla 9,75 mg/mL. Tento roztok byl použit jako vnitřní standard u všech vzorků.

#### Kutikulární extrakt

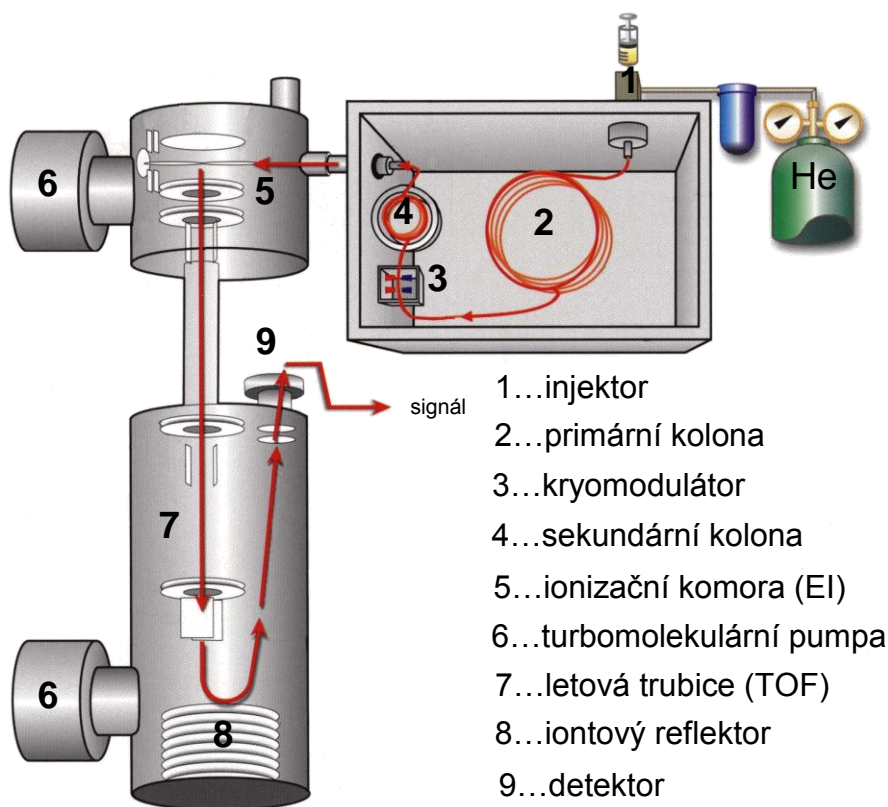
Do vialky byly pipetovány 3 mL hexanu. Celý čmelák byl ponořen do vialky a ponechán 2 min za současného protřepávání (400 otáček/min). Při protřepávání bylo velmi důležité, aby se rozpouštědlo nedostalo k víčku vialky, z důvodů možné kontaminace látkami uvolňujícími se z materiálu těsnění víčka.

Oplach byl přefiltrován přes vatu a zahuštěn argonem na objem 0,5 mL. Do vialek byl pipetován roztok vnitřního standardu o koncentraci 9,75 mg/mL (1 µL 1-bromoikosanu).

### **3.4.2 Chromatografická analýza**

Analýza vzorků kutikulárních oplachů a vzorků po derivatizaci s DMDS byla provedena pomocí komprehenzivní dvoudimenzionální plynové chromatografie na přístroji Pegasus III, Leco Corporation (USA).

Technická konstrukce použitého přístroje GCxGC (Obr. 8) se skládá ze split/splitless injektoru, dvoustupňového kryomodulátoru se 4 tryskami (Dual stage-quad jet modulator) a chromatografu Agilent 6890 s vestavěnou sekundární pecí. K sestavě je připojen hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací (EI) a průletovým analyzátozem „Time Of Flight“ (TOF).



Obr. 8: Schéma GCxGC-TOF/MS (manuál LECO Corporation)

V peci se nacházejí dvě kolony s rozdílnými separačními vlastnostmi zapojené do série. Primární kolona (nepolární) DB-5 (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) poskytovala separaci na základě rozdílných bodů varu jednotlivých látek. Stacionární fázi této kolony tvořil 0,25  $\mu\text{m}$  silný film větveného polydimethylsiloxanu s obsahem 5 % fenylových skupin. Kolona byla dlouhá 30 m, s vnitřním průměrem 0,25 mm. Na sekundární (středně-polární) koloně BPX-50 (SGE Inc. Austin, TX, USA) probíhala separace především díky odlišné polaritě látek. Stacionární fázi tvořil větvený polydimethylsiloxan s 50% přídavkem fenylu. Kolona byla dlouhá 2 m a vnitřní průměr byl 0,1 mm s tloušťkou filmu 0,1  $\mu\text{m}$ .

Mobilní fázi tvořil nosný plyn (helium) s konstantním průtokem 1 ml/min. Pro nástřik vzorků byl použit HP 7683 autosampler. Podle prováděné analýzy byl na kolonu aplikován 1  $\mu\text{l}$  vzorku za použití split nebo splitless modu.

Data byla zpracována a zobrazována za použití programu ChromaTOF<sup>TM</sup>.

#### Experimentální podmínky pro analýzu kutikulárních extraktů

Všechny vzorky byly analyzovány ve split i splitless modu. Split mod byl použit pro identifikaci a kvantifikaci uhlovodíků, jelikož se vyskytují v biologických vzorcích v relativně vysokých koncentracích. Dělicí poměr ve split modu byl 1/20, takže na kolonu přicházelo 5 % z celkového nástřiku vzorku. Splitless mod byl použit pro hledání rozdílných látek mezi jednotlivými skupinami jedinců. Tyto látky se vyskytovaly ve velmi nízkých koncentracích, téměř stopových, proto bylo nutné použít citlivější detekci.

Teplota injektoru byla 320 °C, pro iontový zdroj byla nastavena teplota na 220 °C. Teplotní program pro primární kolonu začínal na 50 °C. Po 1 min teplota rostla do 320 °C rychlostí 10 °C/min. Konečná teplota byla udržována 15 min. Teplotní program na sekundární koloně začínal na 60 °C. Po 1 min rostla teplota rychlostí 10 °C/min až do 330 °C. Konečná teplota byla opět udržována 15 min.

Data byla sbírána rychlostí 100 spekter/s, s rozsahem zaznamenávaných hmot 30-600 *m/z*. Napětí na detektoru bylo 1750 V.

#### Experimentální podmínky pro analýzu vzorků s DMDS

Vzorky byly analyzovány ve split modu s dělicím poměrem 1/20.

Teplota injektoru byla 280 °C, pro iontový zdroj byla nastavena teplota na 220 °C. Teplotní program pro primární kolonu začínal na 70 °C. Po 1 min teplota rostla do 320 °C rychlostí 10 °C/min. Konečná teplota byla udržována 20 min. Teplotní program na sekundární koloně začínal na 80 °C. Po 1 min rostla teplota rychlostí 10 °C/min až do 330 °C. Konečná teplota byla udržována 20 min.

Data byla sbírána rychlostí 100 spekter/s, s rozsahem zaznamenávaných hmot 30-800 *m/z*. Napětí na detektoru bylo 1750 V.

### **3.5 Stanovení poloh dvojných vazeb**

#### Příprava chemikálií

Pro zisk 5% roztoku tiosulfátu sodného bylo naváženo 7,84 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a rozpuštěno ve 100 mL vody. Jodová směs byla připravena navázkou 0,6 g jodu, který byl následně rozpuštěn v 10 mL diethyletheru. DMDS byl přefiltrován přes silikagel.

### Pracovní postup

Z připravených vzorků pro analýzu kutikulárního extraktu (viz. 3.4.1) bylo odebráno automatickou pipetou 200  $\mu\text{L}$ . Do každého vzorku bylo přidáno 200  $\mu\text{L}$  DMDS a 100  $\mu\text{L}$  jodové směsi. Vzorky byly ponechány přes noc ve vodní lázni (40 °C) bez přístupu světla.

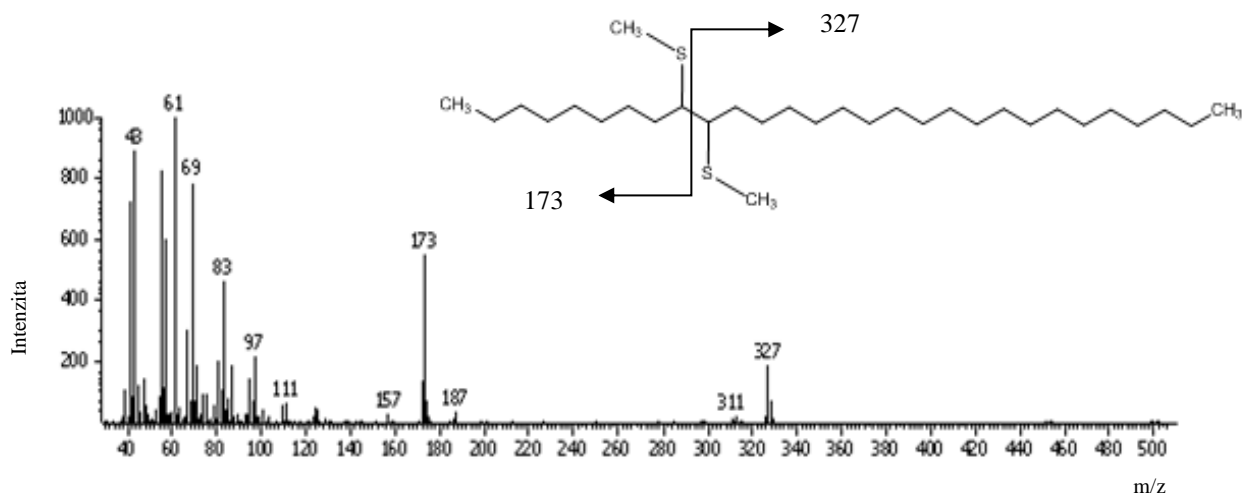
Následující den byly vzorky titrovány 5% roztokem thiosulfátu sodného. Konec titrace byl určen vizuální detekcí, kdy v bodu ekvivalence tmavě hnědý roztok přešel do bezbarvého. Z roztoku byl odebrán hexanový extrakt a odpařen v proudu argonu. Do vialek, ve kterých proběhlo odpaření extraktu, bylo pipetováno 400  $\mu\text{L}$  hexanu. Připravené vzorky byly analyzovány ve split modu pomocí GCxGC-TOF/MS (viz. 3.4.2).

### Určení polohy dvojné vazby

Polohy dvojných vazeb byly určovány u nenasycených uhlovodíků, které se vyskytovaly v nejvyšším zastoupení ve vzorcích (C27=, C29=). Po provedení derivatizace DMDS jsou alifatické řetězce, kde byla původně dvojná vazba, zvětšeny o 47 hmotnostních jednotek (díky navázané skupině  $\text{SCH}_3$ ). Pokud se dvojná vazba vyskytovala v poloze 7, bude mít ve spektru nejintenzivnější signál fragment s hmotnostní 145. Jedna  $\text{CH}_2$  skupina má 14 hmotnostních jednotek a těchto skupin je v tomto případě 7. Jde tedy o alifatický řetězec s obsahem hmotnostních jednotek  $(14 \cdot 7) + 47 = 145$ . Pro určení polohy dvojné vazby v místě 8 nás zajímá fragment 159 ( $145 + 14$ ).

Umístění dvojných vazeb bylo sledováno v polohách 7-13 u královen, 7-10 u samců.

Obr. 9 zobrazuje charakteristické spektrum po derivatizaci analytu s DMDS. Jsou zde jasně viditelné intenzivní signály specifických fragmentů (173 a 327), díky kterým je možné určit polohu dvojné vazby. Fragment 173 jasně určuje, že dvojná vazba se vyskytuje v poloze 9.



Obr. 9 Hmotnostní spektrum aduktu C29=, s dvojnou vazbou v poloze 9, s charakteristickými fragmenty  $m/z$  173 a 327.

### 3.6 Zpracování dat

Analýzou kutikulárních oplachů *BT* byly získány chromatogramy, ze kterých byly odečteny plochy píků žádaných látek. Jednotlivé plochy byly poděleny plochou píku vnitřního standardu.

Vzorky byly rozděleny do 6 základních skupin – královny spárené, nespárené a o spáření se pokoušející; samci spáření, nespáření a o spáření se pokoušející. U biologických vzorků jsou předpokládány rozdíly mezi jedinci. Každý jedinec je jiné velikosti, hmotnosti, stáří... Z těchto důvodů byl experiment proveden na souboru 48 jedinců (přehled v Tab. 1), aby bylo zajištěno dostatečné množství opakování.

U všech látek a v každé skupině byla určena směrodatná odchylka, která vypovídá o tom, jak se od sebe liší zastoupení určité látky v dané skupině jedinců. Směrodatná odchylka tedy postihuje individuální variabilitu.

Směrodatná odchylka byla vypočtena podle vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (5)$$

$x_i$ ...plocha píku (analyt/standard) u  $i$ -tého jedince

$\bar{x}$  ...průměrná hodnota plochy píku (analyt/standard) u n-tého počtu jedinců ve zkoumané skupině

n....počet jedinců ve skupině

Po vypočtení směrodatné odchylky byla určena střední chyba průměru. Střední chyba průměru neboli standardní chyba průměru (standard error of the mean, SEM) označuje, jak moc se získaný průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru. Střední chyby průměru byly zaneseny do grafů v podobě chybových úseček.

Střední chyba průměru byla vypočtena podle vztahu<sup>62</sup>:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

s....směrodatná odchylka

n.....počet jedinců ve skupině

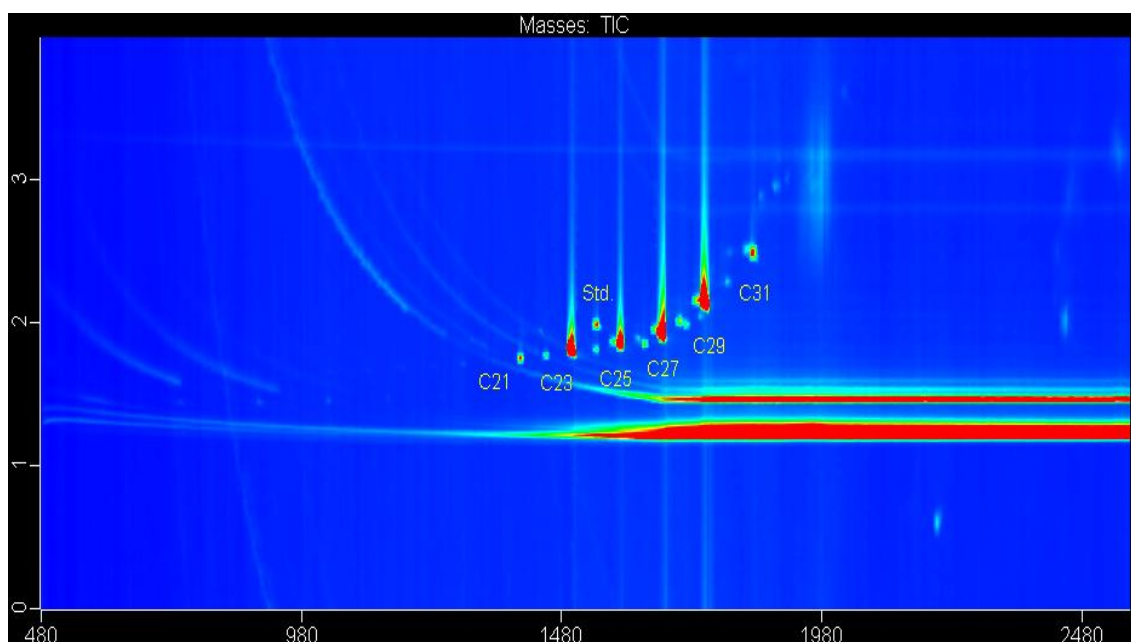
## 4 Výsledky a diskuze

V tomto experimentu bylo pro statistické vyhodnocení dat využito funkcí F-test a T-test (viz. 2.5) pomocí programu Microsoft Office Excel 2010. Dle výsledků p-hodnot z T-testu byly statisticky významné rozdíly znázorněny v grafech. Látky, podle kterých bylo možné určovat rozdíly mezi skupinami, byly identifikovány, semi-kvantifikovány a jejich zastoupení bylo znázorněno graficky.

### 4.1 Identifikace látek

#### 4.1.1 Stanovení uhlovodíků

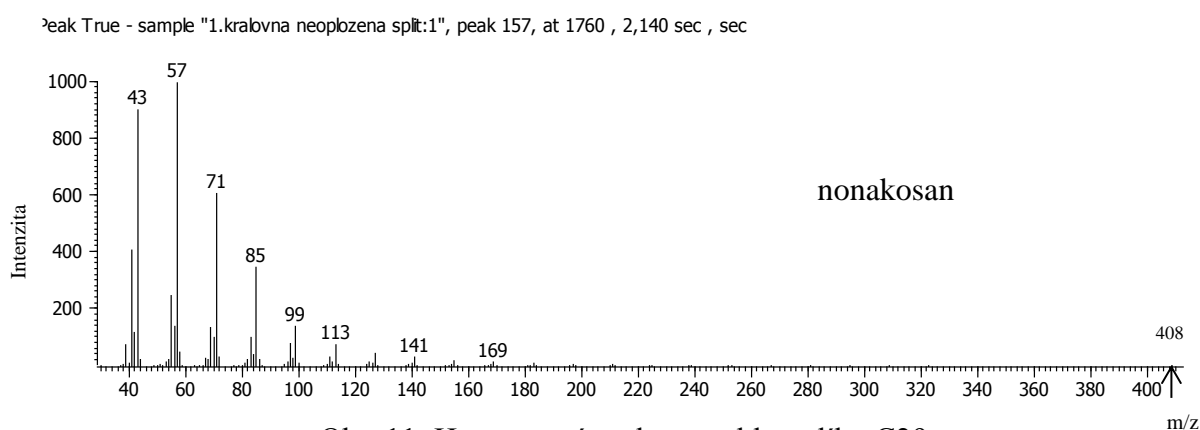
Analýzou vzorků ve split modu byly získány chromatogramy (Obr. 10), pomocí kterých byly stanovovány jednotlivé uhlovodíky v hexanových extraktech.



Obr. 10: Chromatogram extraktu nespářené královny ve split modu

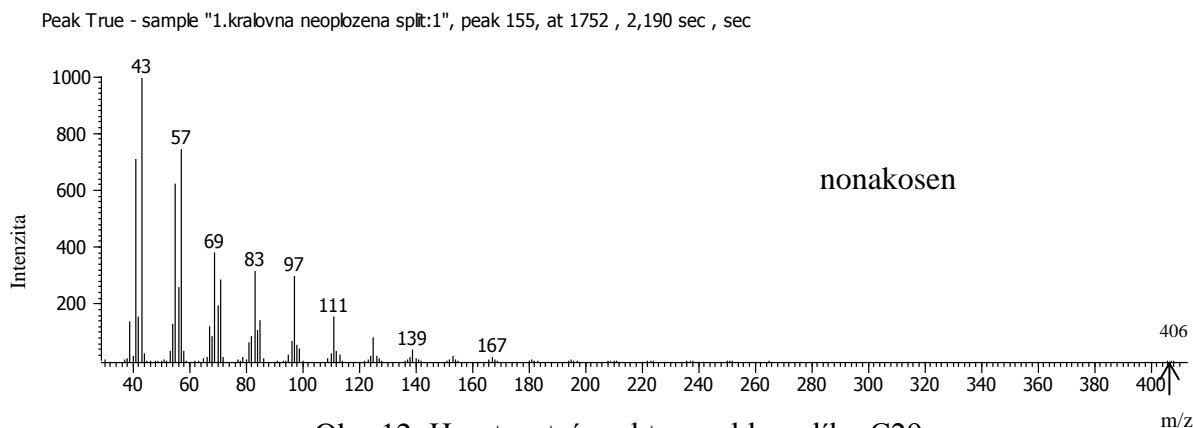
Uhlovodíky byly určeny pomocí hmotnostních spekter dle knihovny NIST MS search 2.0. Jde o typickou homologickou řadu, jak je viditelné na zobrazeném chromatogramu (Obr. 10). Řada uhlovodíků je snadno identifikovatelná GCxGC-TOF/MS metodou, jelikož má charakteristické retenční chování. Po určení jednoho uhlovodíku je snadné identifikovat celou řadu.

Nasycené alifatické uhlovodíky mají charakteristické hmotnostní spektrum s fragmenty – 43, 57, 71, 85, 99 a 113, což je vidět na hmotnostním spektru nonakosanu (Obr. 11).



Obr. 11: Hmotnostní spektrum uhlovodíku C29

Nenasycené alifatické uhlovodíky s jednou dvojnou vazbou mají také charakteristické spektrum s typickými fragmenty – 43, 57, 69, 83, 97 a 111, které lze pozorovat na ukázce hmotnostního spektra nonakosenu (Obr. 12).



Obr. 12: Hmotnostní spektrum uhlovodíku C29=

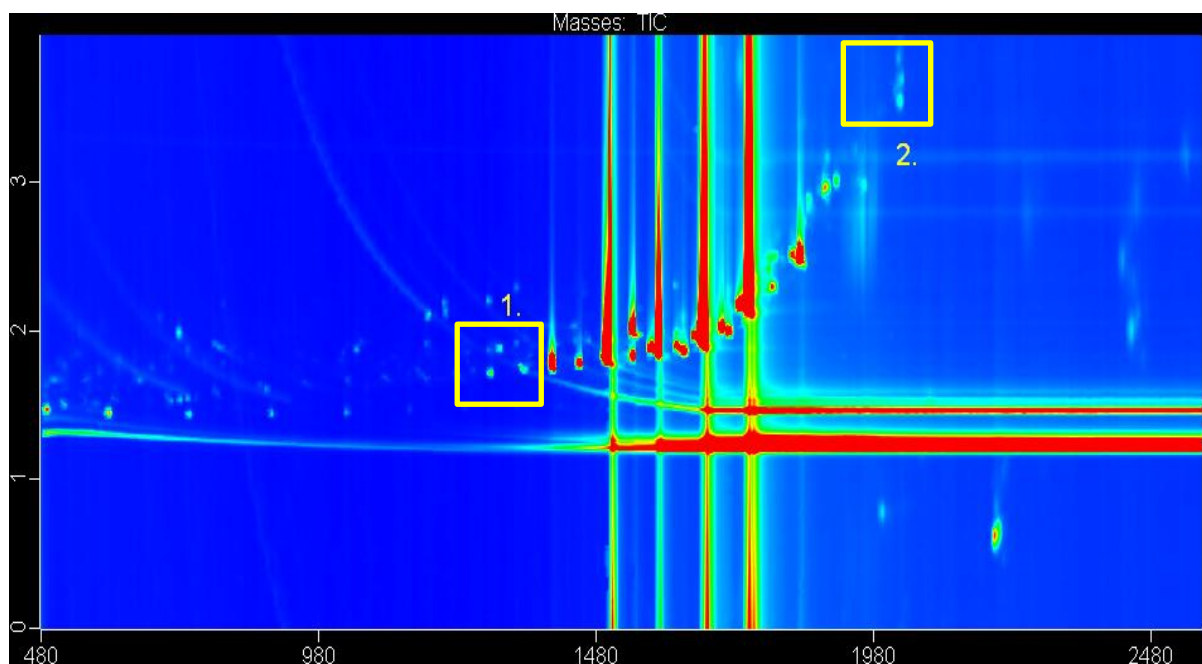
Nenasycené uhlovodíky eluují ve 2. dimenzi před nasycenými. Toto charakteristické chování také usnadňuje identifikaci jednotlivých uhlovodíků.

#### 4.1.2 Stanovení látek ve stopovém množství

V chromatogramech získaných analýzou vzorků metodou GCxGC-TOF/MS byly hledány v citlivějším splitless modu látky, které by poukazovaly na vzájemné rozdíly mezi jedinci. Uhlovodíky C23, C25, C27 a C29 jsou ve splitless modu v příliš vysokých koncentracích a není možné je semi-kvantifikovat. Naopak se zde vyskytují signály látek, které nejsou detekovatelné v chromatogramu ve split modu.

Ve vyznačených oblastech 1 a 2 v chromatogramu (viz. Obr. 13) bylo nalezeno 5 látek – 2 vosky a 3 terpenické látky, které měly rozdílné zastoupení u definovaných skupin jedinců – spáření, nespáření a o spáření se pokoušející.

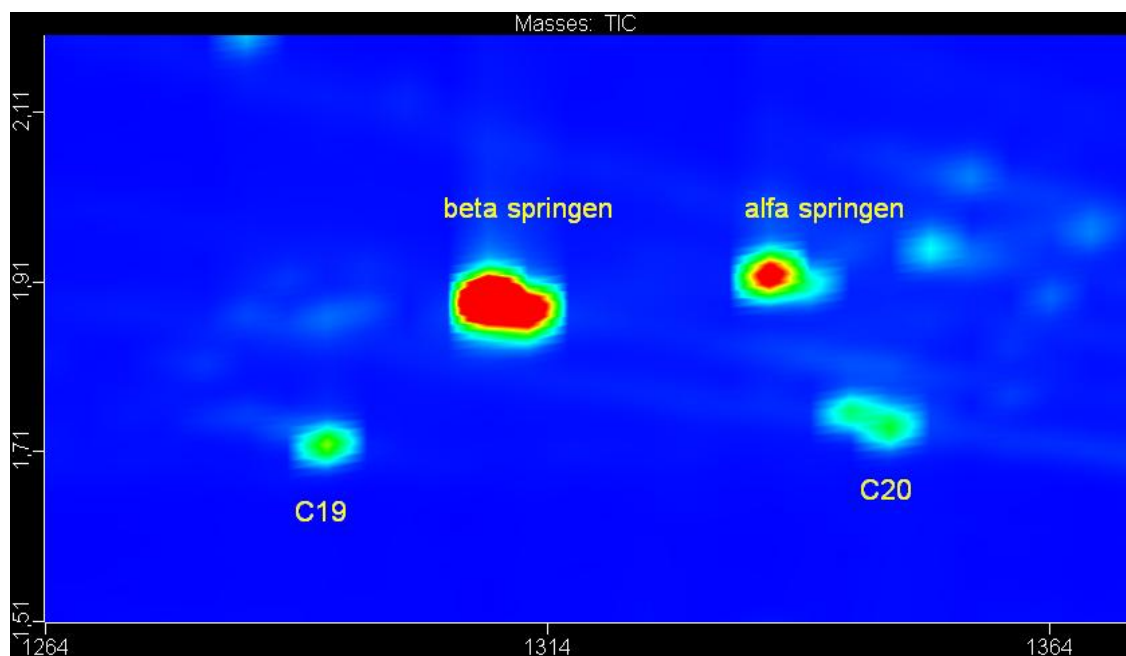




Obr. 13: Chromatogram extraktu královny pokoušející se o spáření v splitless modu

#### 4.1.2.1 Identifikace springenů

Ve vyznačené 1. oblasti (Obr. 13) se vyskytovaly isoprenoidy tzv. springeny. Na obrázku 14 je zobrazeno detailní zvětšení této oblasti.



Obr. 14: Chromatogram extraktu nespářené královny ve splitless modu zobrazující 1. oblast, kde byly nalezeny springeny

Springeny byly identifikovány pomocí Kovatsových indexů. Výsledky Kovatsových indexů byly porovnány s knihovnou NIST MS search 2.0.

Tab. 2: Porovnání Kovatsových indexů (RI)

	Tabelované RI	Experimentální RI
$\beta$ springen	1918	1927
$\alpha$ springen	1969	1978

Experimentální RI se lišily od tabelovaných v obou případech o 9 jednotek. Posun byl pravděpodobně způsoben větším opotřebováním kolony.

### Kovatsův index

Látky mohou být identifikovány také pomocí retenčních indexů. Při tomto způsobu identifikace se porovnávají retenční indexy neznámé látky s látkami, u kterých je retenční index známý.

V plynové chromatografii se využívá nejvíce tzv. Kovatsova indexu<sup>65</sup>. Index se určuje pomocí skupiny referenčních látek, v našem případě n-alkanů<sup>63</sup>. Pomocí Kovatsova indexu byly identifikovány springeny, které se vyskytovaly mezi uhlovodíky C19 a C20 (Obr. 14).

#### Výpočet retenčního indexu (RI):

$$RI = n \cdot 100 + 100 (\log Tr_{an} - \log Tr_n) / (\log Tr_{n+1} - \log Tr_n)^{63} \quad (7)$$

$n$ .....počet atomů uhlíku v nejbližším nižším n-alkanu (19)

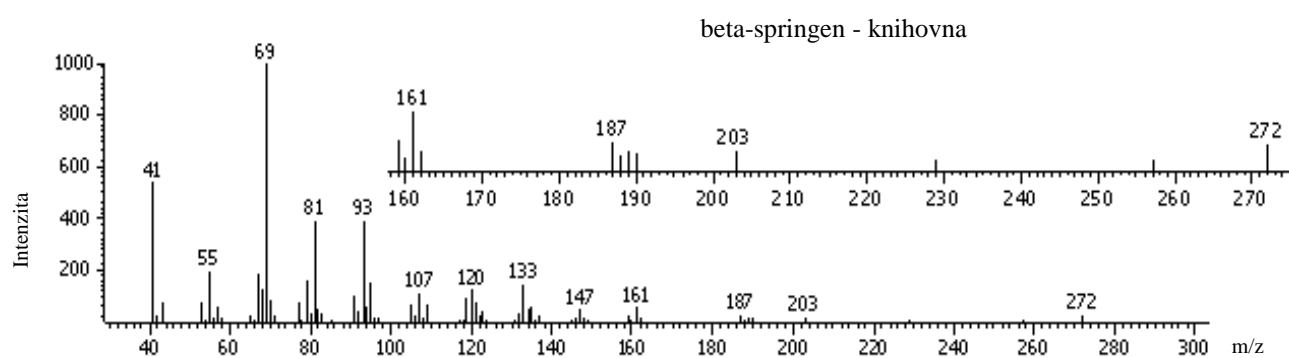
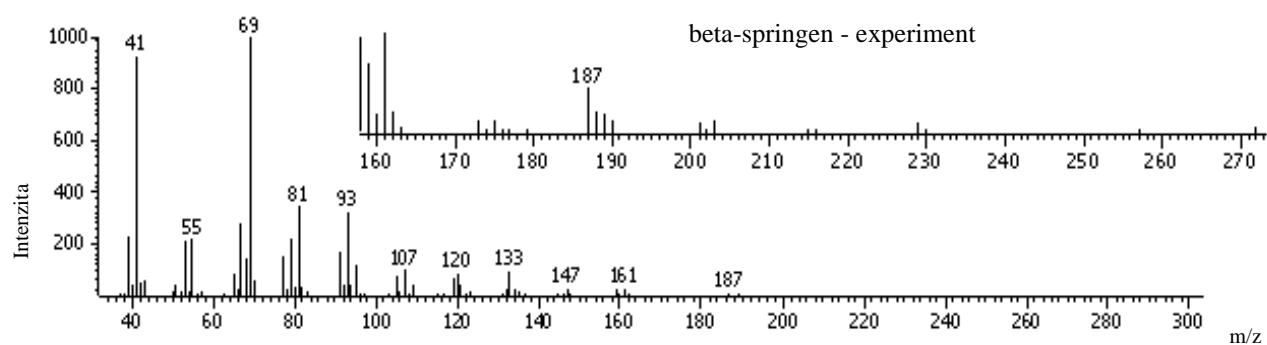
$Tr_{an}$ ....redukovaný retenční čas píku analytu (springenu)

$Tr_n$ ....redukovaný retenční čas nejbližšího nižšího n-alkanu (C19)

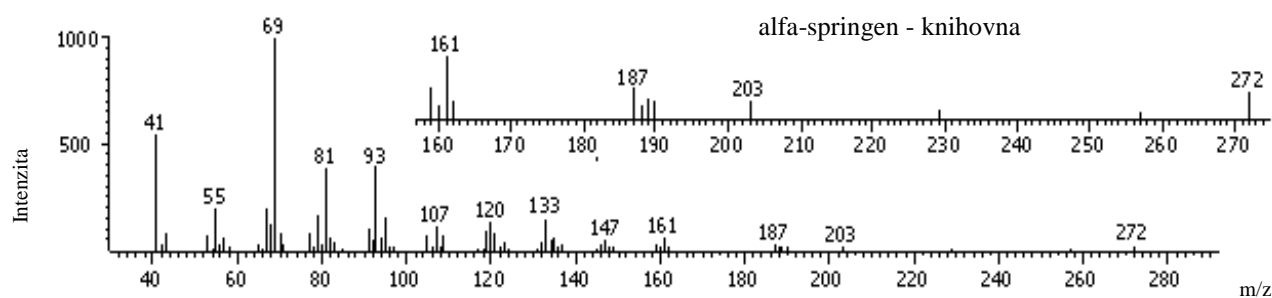
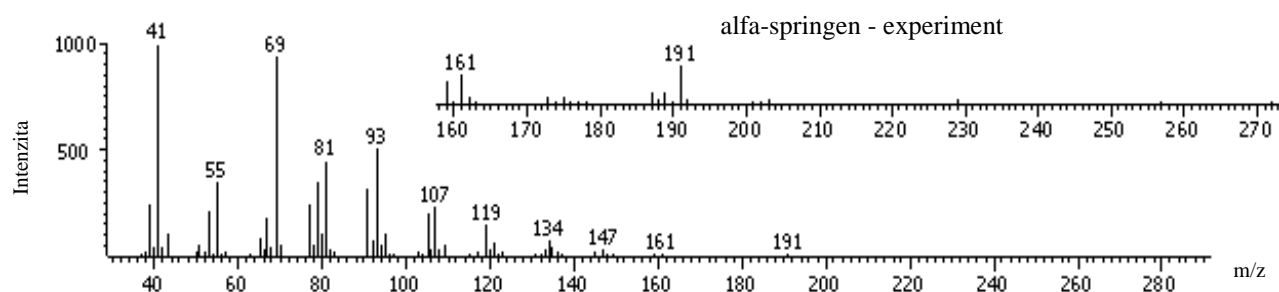
$Tr_{n+1}$ ....redukovaný retenční čas nejbližšího vyššího n-alkanu (C20)

Totožnost springenů byla dále potvrzena shodou hmotnostních spekter s knihovnou NIST MS search 2.0 a spektry v již publikovaném článku<sup>11</sup>.

Na obrázcích 15 a 16 jsou zobrazena hmotnostní spektra  $\beta$  a  $\alpha$ -springenu. V horní části jsou spektra získaná experimentálně. Dolní spektra reprezentují  $\beta$  a  $\alpha$ -springen z knihovny spekter. Každé spektrum obsahuje zvětšenou oblast fragmentů důležitých pro identifikaci.



Obr. 15 Porovnání hmotnostních spekter  $\beta$ -springenu

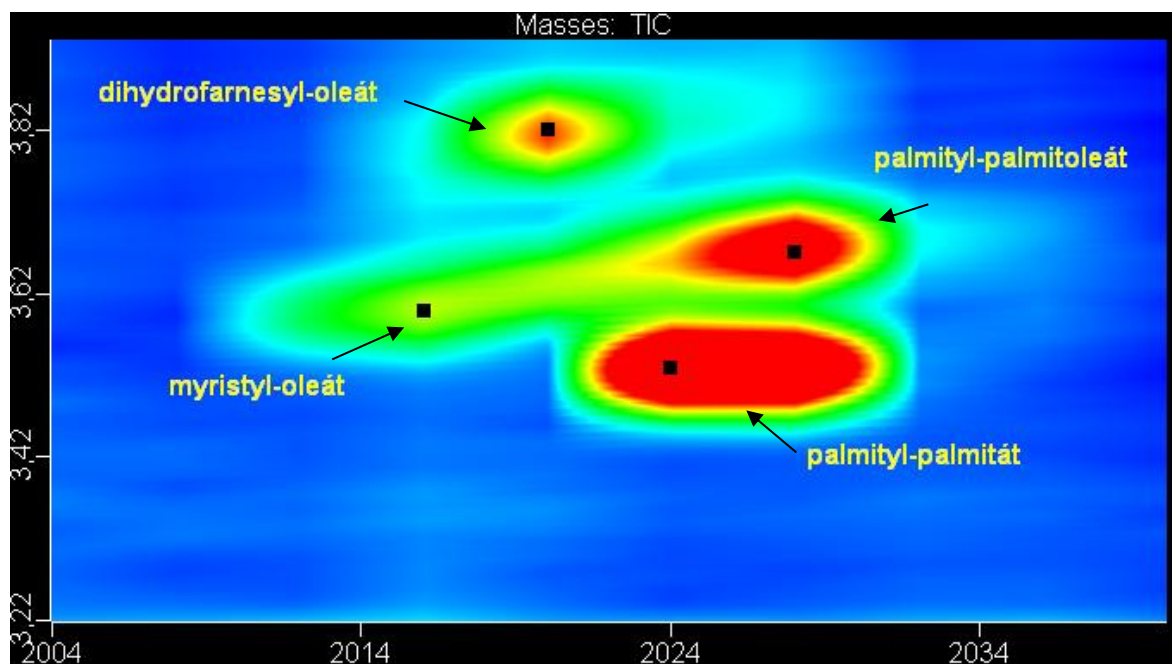


Obr. 16 Porovnání hmotnostních spekter  $\alpha$ -springenu

Spektra  $\alpha$ -springenu a  $\beta$ -springenu jsou velmi podobná, protože jde o polohové izomery. Obě látky mají i stejnou molekulární hmotnost (272). Rozlišení mezi  $\beta$  a  $\alpha$ -springenem proběhlo především podle Kovatsových indexů.

#### 4.1.2.2 Identifikace vosků

Ve vyznačené 2. oblasti (Obr. 13) byly nalezeny zbylé tři látky, které měly rozdílné zastoupení u definovaných skupin jedinců. (V této oblasti byl nalezen i myristyl-oleát, ale u něj nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly mezi jedinci.) Všechny tři látky byly voskového charakteru. Dvě z nich měly alifatickou alkoholovou i kyselinovou část a jedna obsahovala v molekule mastnou kyselinu a terpenický alkohol. Detailní zobrazení chromatogramu této oblasti je na obrázku 17.



Obr. 17: Chromatogram extraktu spárené královny v splitless modu zobrazuje oblast, kde byly nalezeny zbylé 3 látky.

Chromatogram na obrázku 17 je jasnou ukázkou, proč je výhodnější pro analýzy použít GCxGC proti klasické GC. Pokud bychom vyhodnocovali chromatogram získaný analýzou klasické GC v 1D, docházelo by k překryvu palmityl-palmitátu s palmityl-palmitoleátem. Palmityl-palmitoleát by tak bylo obtížné identifikovat a semi-kvantifikovat.

### Identifikace

Látky byly identifikovány podle shody hmotnostních spekter z knihovny NIST MS search 2.0. Totožnost vosků byla potvrzena analýzou komerčně dostupných standardů těchto látek, kdy byla provedena identifikace na základě shody retenčních časů a hmotnostních spekter. Retenční časy jednotlivých vosků byly srovnány s retenčními časy standardů těchto látek. Za stejných chromatografických podmínek se tyto časy shodovaly.

### *Příprava roztoku standardů*

Z 0,1% standardních roztoků palmityl-palmitátu a palmityl-palmitoleátu v hexanu, bylo odebráno automatickou pipetou 10  $\mu$ l. Tyto objemy byly pipetovány do vialky s 30  $\mu$ l hexanu. Vzniklý roztok byl analyzován ve splitless modu pomocí GCxGC-TOF/MS (viz. 3.4.2).

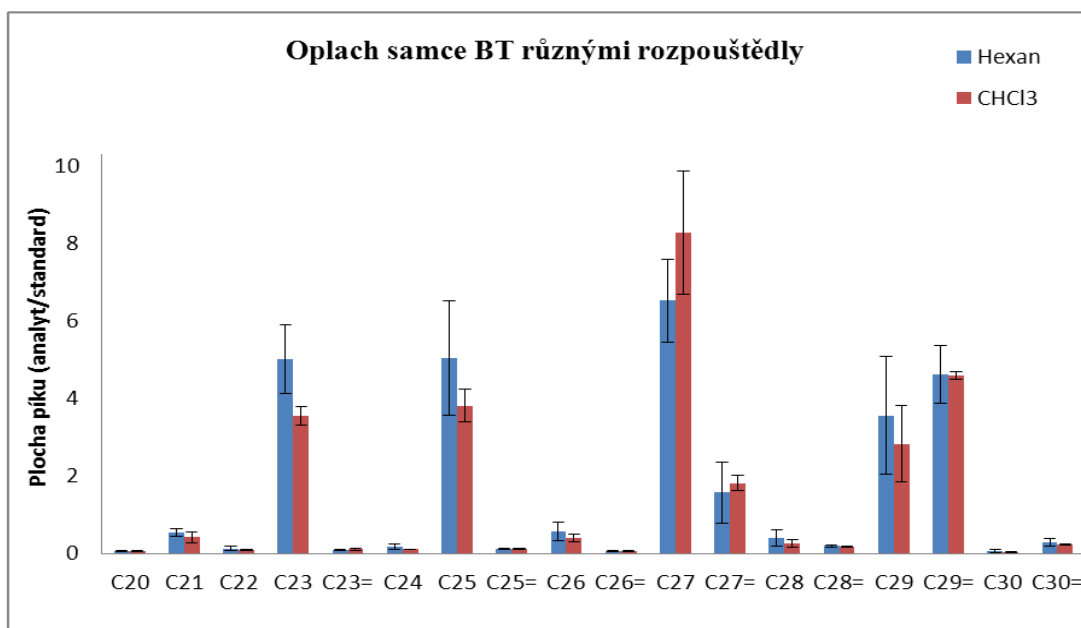
## **4.2 Grafické znázornění zastoupení jednotlivých látek**

Analýzou hexanových oplachů celého souboru jedinců byly nalezeny rozdíly v zastoupení uhlovodíků a 5 látek, které byly voskového a terpenického charakteru. Zastoupení těchto látek je znázorněno graficky. Grafické znázornění bylo provedeno i při určování vhodného rozpouštědla pro experiment. Pokud byl rozdíl mezi skupinami statisticky významný, byly dané skupiny označeny hvězdičkou. Statisticky významné rozdíly byly určeny podle výsledků p-hodnot z T-testu.

( $p < 0.05$  - \*,  $p < 0.01$  - \*\*,  $p < 0.001$  - \*\*\*)

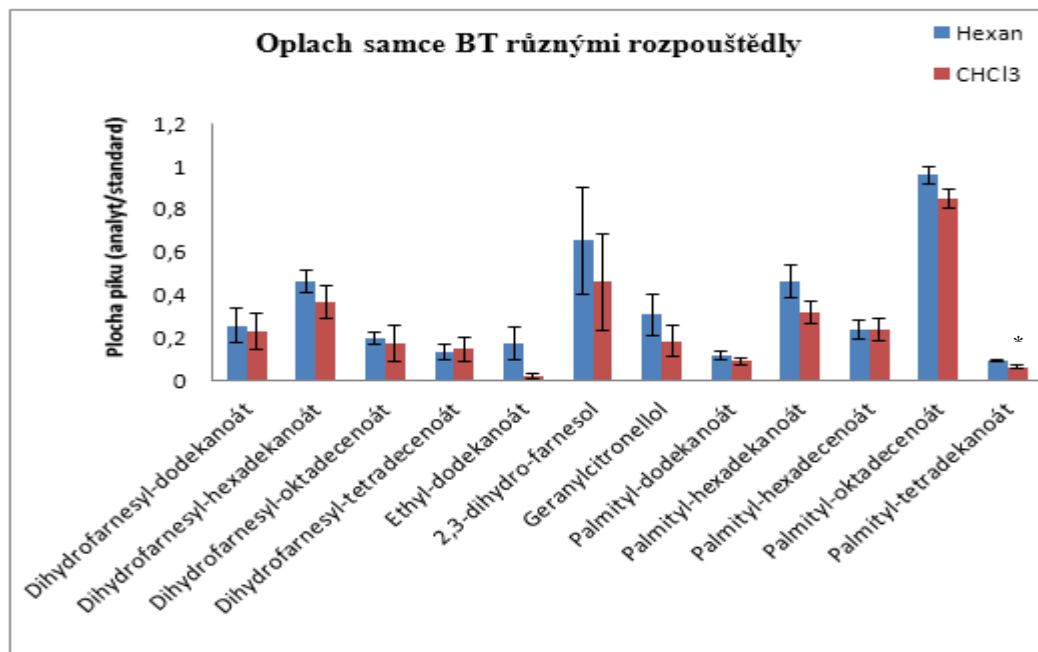
### **4.2.1 Určení vhodného rozpouštědla**

Byly provedeny kutikulární oplachy šesti samců *BT* za účelem nalézt vhodné rozpouštědlo, které se bude používat jako extrakční činidlo během celého experimentu. Účinnost extrakce byla testována na dvou různých nepolárních rozpouštědlech – chloroform a hexan, která jsou vhodná pro získání žádaných látek. Pro snadnější orientaci byly nalezené látky v kutikulárním oplachu rozděleny v grafech do dvou skupin.



Graf 1: Porovnání pro uhlovodíky

Graf 1 poukazuje na vzájemné rozdíly mezi zastoupením analyzovaných uhlovodíků při použití dvou různých rozpouštědel. Je zřejmé, že v množství uhlovodíků při oplachu hexanem nebo chloroformem nebyly nalezeny žádné větší rozdíly. V několika případech (C23, C25 a C29) se hexan jevil jako účinnější rozpouštědlo, ale tyto rozdíly nebyly statisticky významné.



Graf 2: Porovnání pro kutikulární vosky a estery

Na druhém grafu je zobrazena účinnost extrakce u kutikulárních vosků a esterů. I v tomto grafu se hexan v několika případech jeví jako vhodnější rozpouštědlo (ethyl-dodekanoát, palmityl-hexadecenoát, palmityl-oleát a palmityl-tetradecenoát). Statisticky významný rozdíl byl však nalezen pouze u palmityl-tetradecenoátu, kde se hexan ukázal jako účinnější extrakční činidlo.

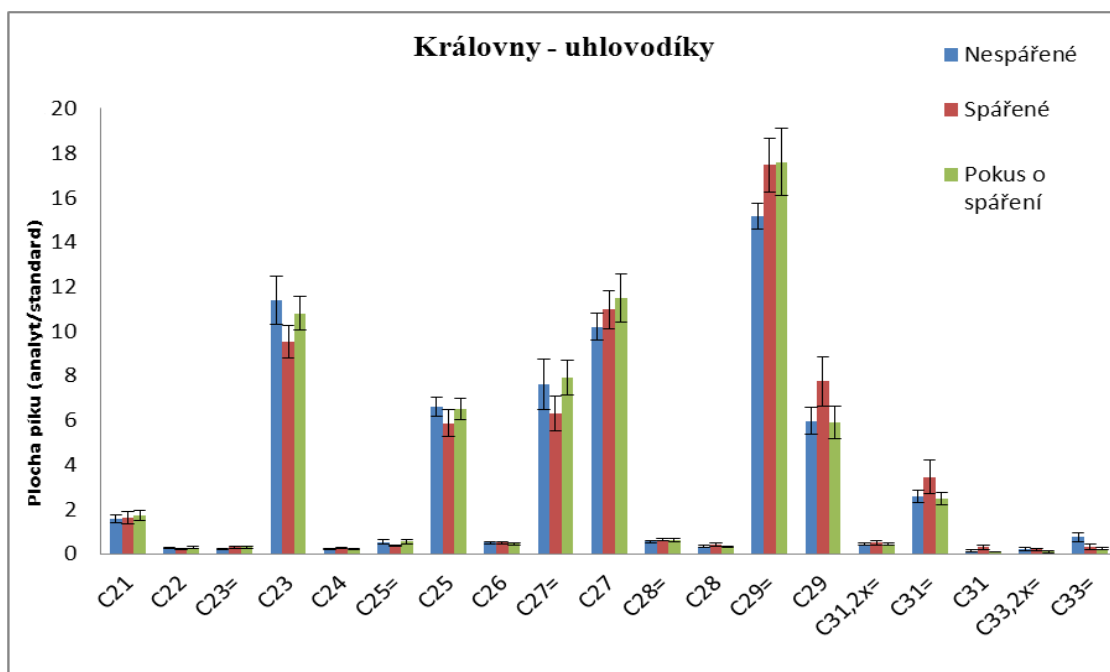
Podle těchto grafů a statistického vyhodnocení bylo určeno, že hexan je pro tento experiment vhodnější rozpouštědlo. Jednotlivé rozdíly mezi rozpouštědly nebyly tak markantní. Při výběru mezi hexanem a chloroformem je třeba vzít v úvahu, že chloroform je zdraví škodlivé rozpouštědlo. Pokud obě rozpouštědla podávají téměř stejný výsledek, je vhodnější zvolit to méně škodlivé, tedy hexan.

#### 4.2.2 Uhlovodíky

Analýzou kutikulárních oplachů souboru zkoumaných *BT* za použití split modu bylo určeno množství uhlovodíků u královen i samců. Maximální koncentrace byly nalezeny v uhlovodících s lichým počtem uhlíků - C23, C25, C27=, C27, C29=, C29 a C31=.

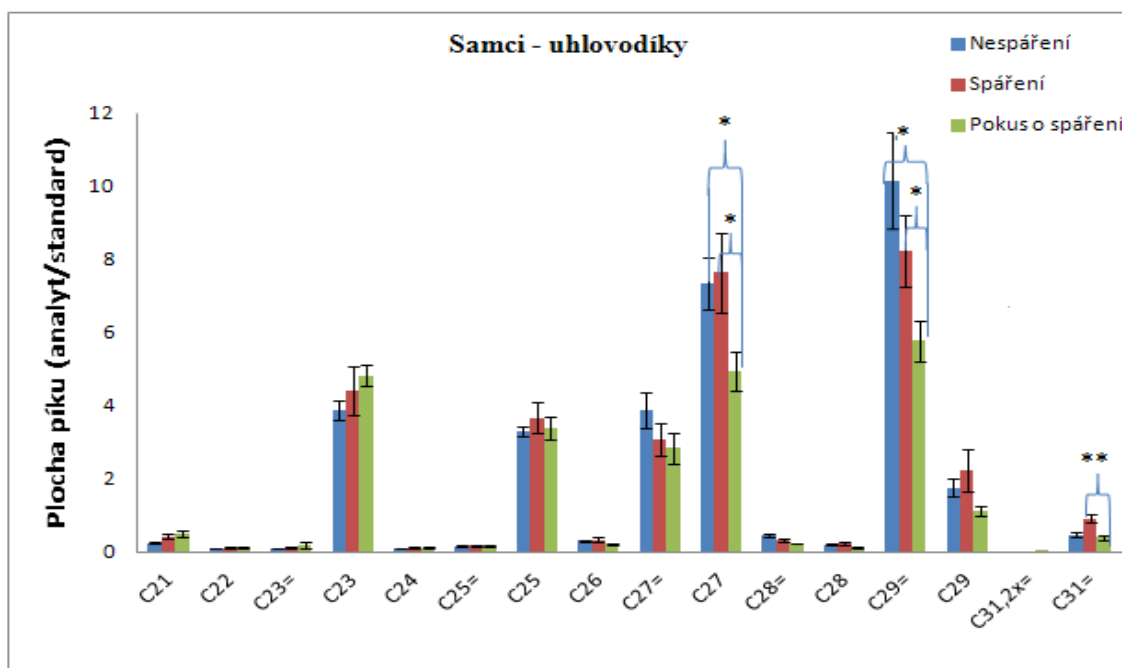
Stejných výsledků bylo dosaženo i v podobném experimentu, kdy byly analyzovány složky hlavních exokrinních žláz u *BT*<sup>3</sup>. Uhlovodíky hrají významnou roli ve žlázových sekretech *BT* (viz. 2.3). V labiální žláze samců dominují uhlovodíky v rozmezí C21-C27. Tendonová žláza obsahuje především C23, C25 a C27 (viz. 2.3.4). V sekretech Dufourovy žlázy se vyskytují uhlovodíky od C21 do C30 (viz. 2.3.5).

U královen byly nalezeny uhlovodíky v rozsahu C21 až C33= (Graf 3). U samců byly identifikovány uhlovodíky pouze v rozmezí od C21 do C31= (Graf 4). Královny při analýze ve split modu obsahují navíc uhlovodíky C31,2x=, C31, C33,2x= a C33. Tento výsledek může být dán tím, že královna je výrazně větší oproti samci, takže i kutikulární povrch, který je extrahován, má větší rozměry. V těchto extraktech se tedy látky mohou vyskytovat ve vyšších koncentracích než u samců.



Graf 3: Zastoupení kutikulárních uhlovodíků u královen

Na grafu 3 lze pozorovat, že v zastoupení uhlovodíků u jednotlivých skupin královen – nespárené, spárené a pokoušející se o spáření, nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly. Skupiny královen tedy není možné mezi sebou rozlišit pomocí koncentrací jejich kutikulárních uhlovodíků.



Graf 4: Zastoupení kutikulárních uhlovodíků u samců



Při stanovení množství kutikulárních uhlovodíků u samců (Graf 4) byly nalezeny statisticky významné rozdíly v uhlovodících C27 a C29= mezi nespářenými a o spáření se pokoušejícími jedinci. Mezi spářenými a o spáření se pokoušejícími jedinci byly nalezeny významné rozdíly v uhlovodících C27, C29= a C31=. Samci se tedy na rozdíl od královen liší v zastoupení uhlovodíků.

Samci, kteří se pokoušeli o spáření, ale neuspěli, mají v těchto rozdílných zastoupeních vždy nejmenší množství uhlovodíků. Tento fakt může vypovídat o atraktivitě těchto samců. Je možné, že královna preferuje samce s vyšším obsahem kutikulárních uhlovodíků.

### 4.2.3 Látky voskového a terpenického charakteru

Analýzou kutikulárních oplachů souboru zkoumaných *BT* za použití splitless modu bylo identifikováno 5 látek, podle kterých je možné pozorovat vzájemné rozdíly mezi spářenými, nespářenými a o spáření se pokoušejícími jedinci (Graf 5 a 6). Látky jsou voskového a terpenického charakteru.

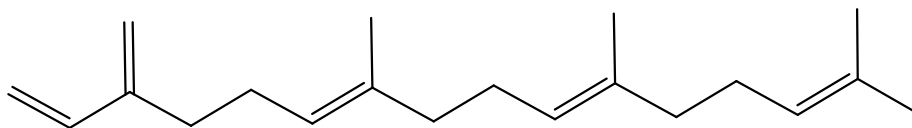
#### Identifikované látky:

palmityl-palmitát (hexadecyl-hexadekanoát)

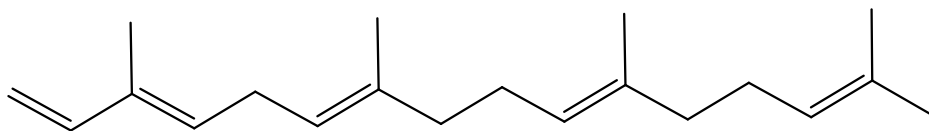
palmityl-palmitoleát (hexadecyl-hexadec-9-enoát)

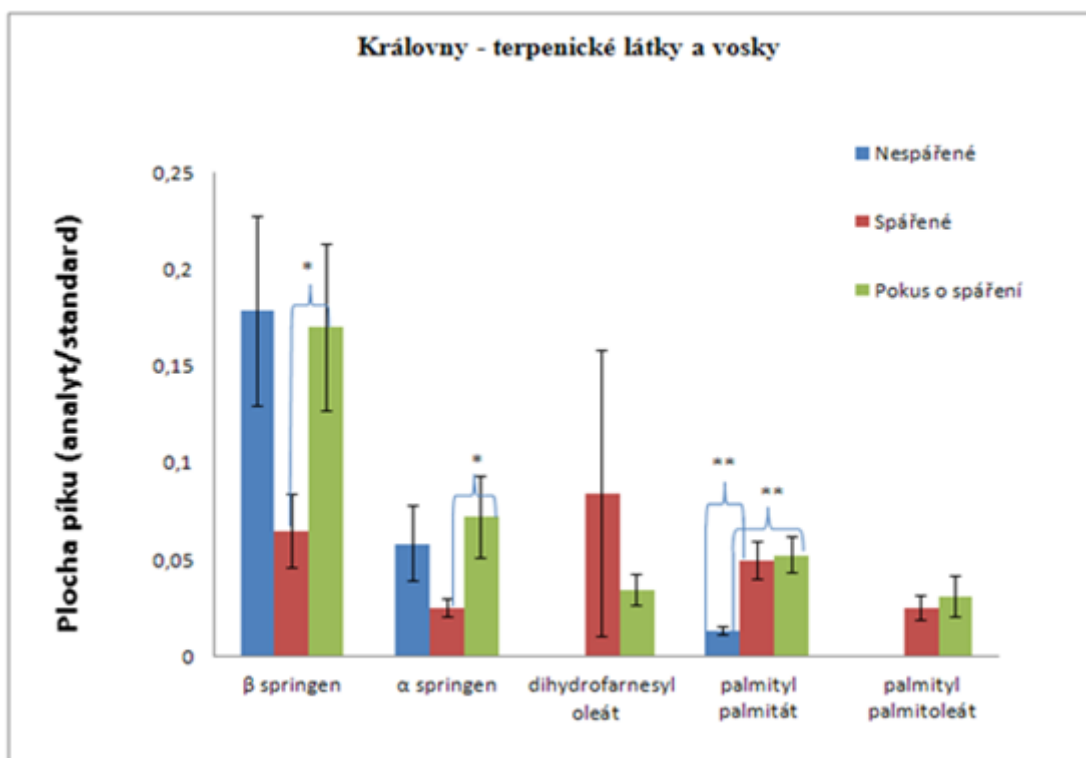
dihydrofarnesyl-oleát (dihydrofarnesyl oktadec-9-enoát)

β springene {(*E,E*)-7,11,15-trimethyl-3-methylene-hexadeka-1,6,10,14-tetraen}



α springene {(*E,E,E*)-3,7,11,15-tetramethylhexadeka-1,3,6,10,14-pentaen}





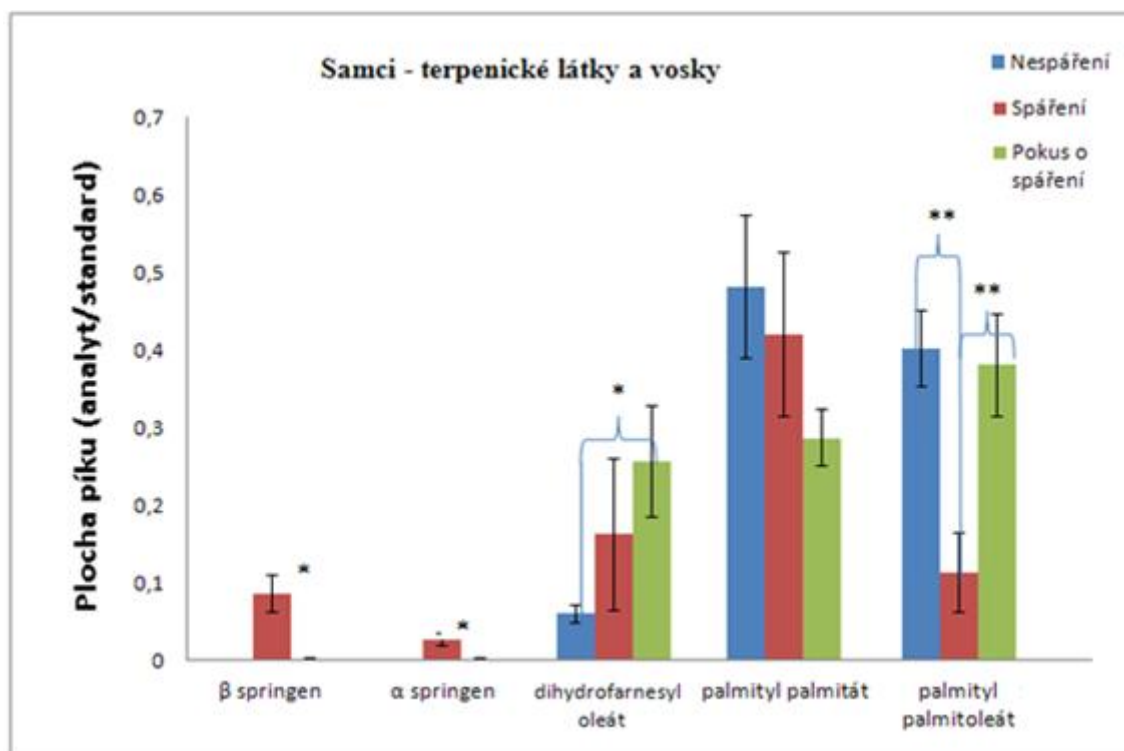
Graf 5: Zastoupení jednotlivých látek u královen

V grafu 5 jsou zobrazeny identifikované látky, díky kterým můžeme určit rozdíly mezi skupinami královen. Je zřejmé, že jsou zde čtyři statisticky významné rozdíly a absence dvou látek u panenských královen.

Statisticky významné rozdíly byly nalezeny v množství springenů a to pouze mezi spářenými a o spáření se pokoušejícími královnami, kdy spářené královny obsahují výrazně nižší zastoupení springenů proti královnám, které se o spáření pouze pokoušely.

Dále bylo významně rozdílné zastoupení u palmityl-palmitátu mezi nespářenými a spářenými královnami a zároveň mezi nespářenými a o spáření se pokoušejícími královnami. V obou případech obsahovaly nespářené královny výrazně nižší zastoupení palmityl-palmitátu proti zbylým skupinám královen.

Kutikulární extrakt nespářených královen vůbec neobsahoval palmityl-palmitoleát a dihydrofarnesyl-oleát. Analýzou látek na povrchu kutikuly je tedy možné rozpoznat, zda došlo ke spáření královny.



Graf 6: Zastoupení jednotlivých látek u samců

V grafickém znázornění zastoupení rozdílných látek u samců (Graf 6) jsou viditelné výrazné odlišnosti na první pohled, stejně jako u královen. V zastoupení množství dihydrofarnesyl-oleátu a palmityl-palmitoleátu se vyskytují statisticky významné rozdíly. U nespářených jedinců opět chybí dvě látky.

Ve srovnání s ostatními samci spáření jedinci obsahují statisticky významně nižší koncentrace palmityl-palmitátu. Další rozdílné zastoupení se vyskytovalo u dihydrofarnesyl-oleátu mezi nespářenými a o spáření se pokoušejícími jedinci, kdy nespáření samci měli tuto látku v menším množství.

Skupiny samců se výrazně odlišují v zastoupení springenů. Největší koncentrace byly nalezeny u spářených jedinců. Samci, kteří se pokoušeli spářit, mají stopové koncentrace springenů a nespáření samci je neobsahují vůbec. Springeny patří mezi nově identifikované látky u čmeláků. Jedná se o izoprenoidní uhlovodíky, které jsou vzájemnými polohovými izomery. Liší se pouze polohou dvojnás vazby na třetím atomu uhlíku. Tyto látky byly u čmeláků prvně identifikovány při analýze labiální žlázy *Bombus griseocollis*. β-Springene byl již izolován z různých organismů, včetně žlázy plazů, dorsální sekrece savců a v Dufourově žláze mravenců<sup>11</sup>.

### 4.3 Spojitosti mezi jedinci v rámci zastoupení stopových látek

Díky látkám, které se vyskytovaly ve stopovém množství u zkoumaných jedinců a prokázaly rozdílné zastoupení u jednotlivých skupin, bylo možné určit vzájemné souvislosti mezi skupinami zkoumaných jedinců.

Tab. 3: Souhrnné rozdíly v zastoupení látek mezi definovanými skupinami

	královny			samci		
	N	S	P	N	S	P
<b><math>\beta</math>-springen</b>	X	* S<P	* P>S	0	* P<S	* S>P
<b><math>\alpha</math>-springen</b>	X	* S<P	* P>S	0	* S<P	* P>S
<b>dihydrofarnesyl-oleát</b>	0	X	X	* N<P	X	* P>N
<b>palmityl-palmitát</b>	** N<S, ** N<P	** S>N	** P>N	X	X	X
<b>palmityl-palmitoleát</b>	0	X	X	** N>S	** S<N, ** S<P	** P>S

N - nespáření, S – spáření, P – o spáření se pokoušející jedinci

X žádný významný rozdíl

0 daná látka není přítomna

U statisticky významných rozdílů je dle porovnávacích znamének určeno, která skupina obsahuje danou látku v menším zastoupení.

#### *Springeny*

V tomto experimentu bylo nejvíce rozdílů mezi jedinci nalezeno v zastoupení springenů. Izomery springenu  $\alpha$  a  $\beta$  měly shodné zastoupení i statisticky významné rozdíly u všech skupin jedinců.

Spářené královny obsahují významně nižší množství springenů než královny o spáření se pokoušející. Naopak u samců obsahují springeny převážně jen spáření jedinci. Samci pokoušející se o spáření je obsahovali ve stopovém množství. Nespáření samci, kteří ani nepřišli do kontaktu s královnou, je neobsahovali vůbec. Tyto rozdílnosti vedou k možnému závěru, že při kopulaci *BT* dochází k přenosu springenů z královny na samce.

Z tohoto důvodu mají spárené královny menší množství springenů a nespáření samci je neobsahují vůbec.

Springeny byly u čmeláků nalezeny prvně v sekretu labiální žlázy *Bombus griseocollis*<sup>11</sup>, kde sloužily jako samčí značkovací feromon, kterým samci lákají panenské královny ke kopulaci. Je známo, že sekret labiální žlázy je druhově specifický a i u úzce příbuzných druhů může být složení sekretu výrazně odlišné. Je možné, že u jednoho druhu čmeláků mohou springeny fungovat jako samčí feromony a u druhého mít zcela odlišnou funkci.

Primárně je důležité, že i v tomto experimentu se potvrdilo, že springeny hrají roli v chemické komunikaci čmeláků. U *BT* jsou springeny nejspíš spojeny s kopulačním chováním jedinců. Podle dosažených výsledků je možné předpokládat, že springeny jsou produkovány královnou. Pravděpodobným zdrojem sekretu by mohla být mandibulární žláza královen, protože je z ní produkován jejich sexuální feromon.

Bude za potřebí dalších experimentů pro určení jejich přesné funkce v chemické komunikaci čmeláků.

### ***Dihydrofarnesyl-oleát***

Tento terpen je další látkou, která nebyla vůbec přítomna v kutikulárním extraktu nespářených královen. Samci, kteří se pokoušeli o spáření, měli tuto látku ve větším zastoupení proti nespářeným samcům. Podle přítomnosti dihydrofarnesyl-oleátu v kutikulárním extraktu královen je možné rozlišit nespářenou královnu od zbylých skupin. Nespáření jedinci tuto látku obsahují buď ve významně nízké koncentraci, nebo vůbec. Tato látka má pravděpodobně určitou roli v kopulačním chování jedinců.

Je možné, že samci, kteří jsou v blízkosti královny, zvýší produkci těchto látek a dochází k přenosu dihydrofarnesyl-oleátu během kopulačního chování ze samce na královnu. Zdrojem této látky může být labiální žláza samců, protože v této žláze již bylo nalezeno velké zastoupení různých typů dihydrofarnesyl esterů (viz. 2.3.1).

Dalším zdrojem může být nově objevená tendonová žláza (viz. 2.3.4), která má otvor pro sekreci umístěný v chodidle. Během kopulace samci *BT* opakovaně otírají nohy o tělo královny, čímž může docházet k přenosu sekretu z tendonové žlázy na povrch těla královny.

### ***Palmityl-palmitát***

V tomto případě byly nalezeny statisticky významné rozdíly pouze u královen. Nespárené královny měly výrazně nižší koncentrace palmityl-palmitátu oproti zbylým skupinám královen. Během kopulačního chování dochází pravděpodobně ke kontaminaci královen sekretem ze samce. Zdrojem tohoto sekretu může být opět labiální nebo tendonová žláza samců.

### ***Palmityl-palmitoleát***

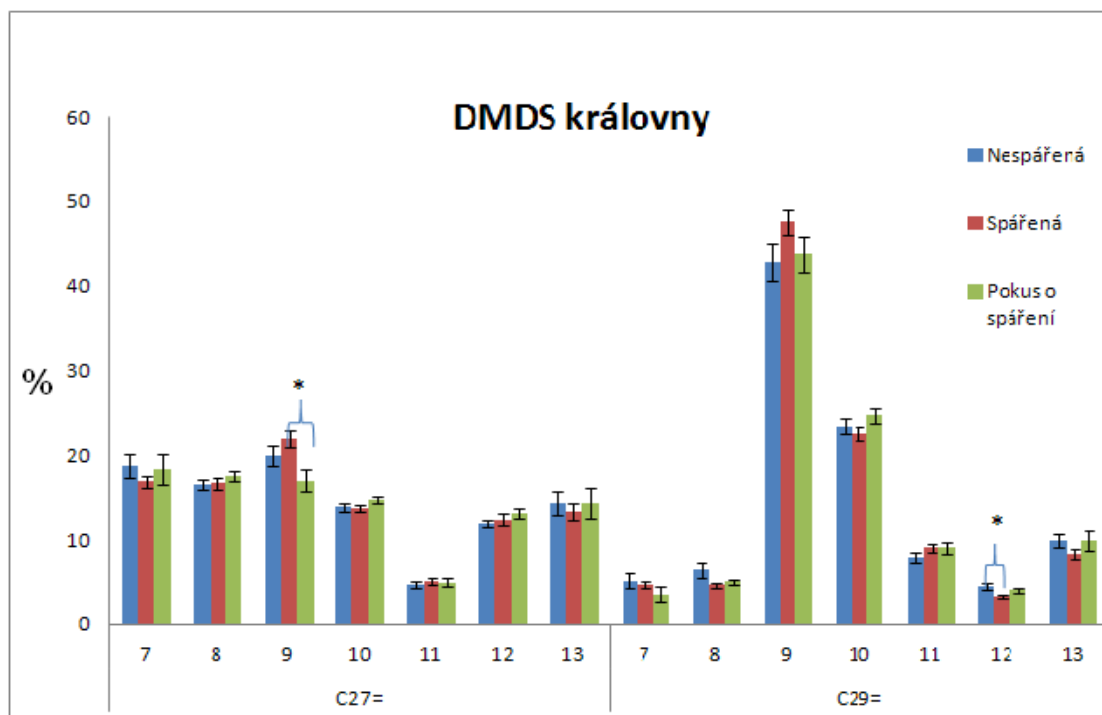
Nespárené královny tuto látku vůbec neobsahují. Zastoupením této látky u královen je tedy možné rozlišit nespárenou královnu od zbylých skupin královen.

Skutečnost, že spáření samci tuto látku obsahují ve výrazně nižších zastoupeních proti zbylým skupinám samců a nespárené královny látku neobsahují vůbec, vede k závěru, že pravděpodobně dochází k přenosu palmityl-palmitoleátu během kopulace ze samce na královnu. Zdrojem této látky, stejně jako u dihydrofarnesyl-oleátu a palmityl-palmitátu, může být labiální nebo tendonová žláza samců.

## **4.4 Určení polohy dvojné vazby**

Polohy dvojných vazeb byly určovány u uhlovodíků  $C_{27=}$  a  $C_{29=}$ . Procentuální zastoupení dvojných vazeb v jednotlivých polohách u královen a samců je znázorněno graficky (Graf 7 a Graf 8). Pozice dvojné vazby může změnit chemické a fyzikální vlastnosti molekuly, což by mohl daný jedinec při chemické komunikaci rozpoznat a může to sloužit jako druh specifické informace.

U královen se dvojná vazba vyskytuje nejčastěji v polohách 7 – 13. U samců je dvojná vazba obvykle nejvíce zastoupena v poloze 9, ale její výskyt je možný i v polohách 7 - 10.

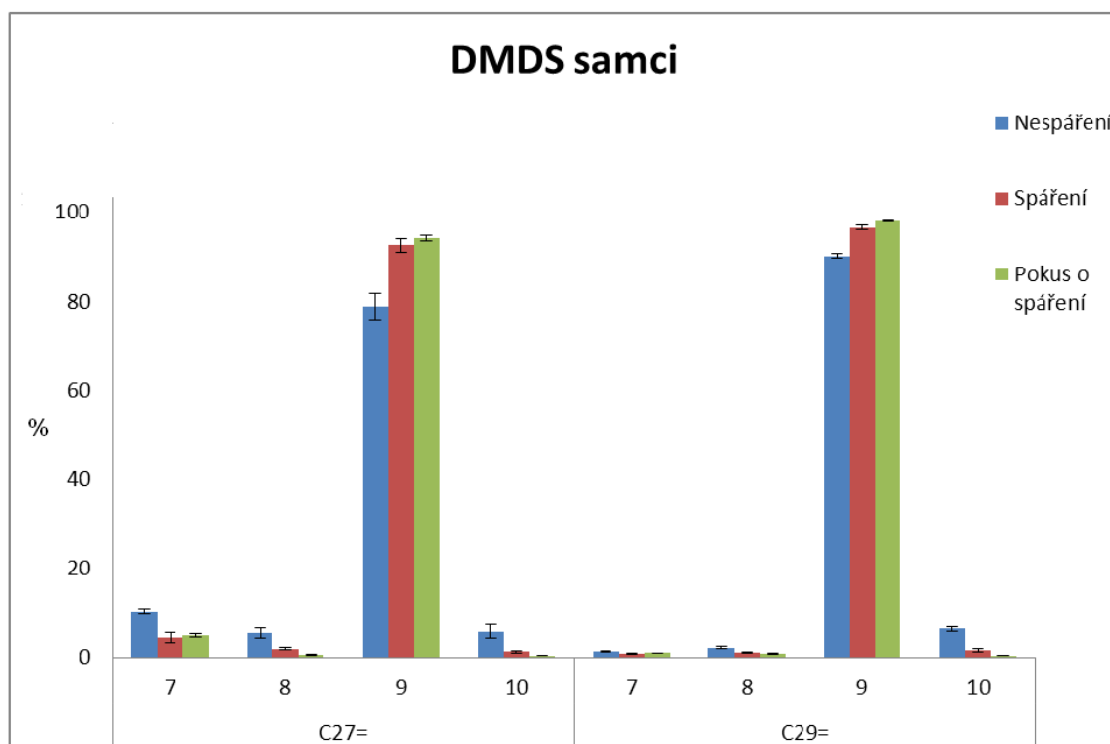


Graf 7: Distribuce dvojné vazby u královen

Na grafu 7 je viditelné procentuální rozložení umístění dvojné vazby v jednotlivých polohách u uhlovodíků C27= a C29=. Uhlovodík C27= obsahoval dvojnou vazbu rovnoměrně v polohách 7 - 13, pouze u polohy 11 bylo procentuální zastoupení viditelně nižší. Byl pozorován statisticky významný rozdíl v zastoupení dvojné vazby v poloze 9, kdy se u spářených královen vyskytovala dvojná vazba v poloze 9 častěji než u královen, které se pokoušely o spáření.

U uhlovodíku C29= se vyskytovala dvojná vazba nejčastěji v poloze 9 a poměrně často i 10. Ve zbylých polohách bylo procentuální zastoupení dvojné vazby rovnoměrné. Významný rozdíl byl nalezen u polohy 12, kdy nespářené královny měly vyšší zastoupení dvojné vazby oproti spářeným.

U samců bylo určováno umístění dvojné vazby pouze v polohách 7 - 10, protože u nich se dvojná vazba vyskytuje nejčastěji v poloze 9 (Graf 8).



Graf 8: Distribuce dvojné vazby u samců

Dvojn  vazby v uhlovodících C27= a C29= u samců se vyskytovaly p ev zn  v poloze 9. Statisticky v znamn  situace nebyly zakresleny do grafu. Těchto situací se vyskytuje p l i  mnoho a pro větší přehlednost jsou tyto údaje uvedeny do tabulky 4.

Tab. 4: Statisticky v znamn  rozdíly u samců při DMDS

Uhlovod�k	Poloha $\pi$ vazby	Sp��ren� x Pokus	Nesp��ren� x Sp��ren�	Nesp��ren� x Pokus
C 27	7	-	***	*
	8	*	**	**
	9	*	**	*
	10	*	*	*
C29	7	*	-	-
	8	**	**	**
	9	***	***	*
	10	***	***	*

Statisticky v znamn  rozdíly se vyskytovaly nejhojněji při určení polohy dvojn  vazby u samců, kdy se téměř všechny skupiny v razn  odlišovaly (Tab. 4).



Výrazné rozdíly v zastoupení dvojně vazby jsou pozorovatelné především mezi nespářenými samci a zbylými skupinami samců. Je zde možná kontaminace samce látkami z povrchu královny. Královna má větší povrch a může kontaminovat samce větším množstvím uhlovodíků než on ji.

U spářených královen se dvojná vazba u C27= vyskytovala častěji v poloze 9 pravděpodobně z důvodu kontaminace povrchem těla samce, protože samci obsahují dvojnou vazbu především v poloze 9. V tomto případě ke specifické produkci určitých izomerů nedochází, pravděpodobně jde pouze o vzájemnou kontaminaci jedinců během páření.

## 5 Závěr

V této práci byl studován přenos chemických látek během kopulačního chování mezi jedinci *Bombus terrestris* metodou dvourozměrné komprehensivní plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Předmětem analýz byly hexanové kutikulární extrakty čmeláků *BT*. Na základě získaných výsledků byly posuzovány vzájemné rozdíly či spojitosti mezi definovanými skupinami jedinců – spáření, nespáření a o spáření se pokoušející.

V extraktech byly identifikovány a semi-kvantifikovány uhlovodíky v rozmezí C21 – C33=. Maximální koncentrace byly nalezeny v C23, C25, C27=, C27, C29=, C29 a C31=. U samců byly pozorovány statisticky významné rozdíly v zastoupení u C27, C29= a C31=. Samci, kteří se pokoušeli o spáření a neuspěli, obsahovali v těchto rozdílných zastoupeních nejmenší množství uhlovodíků. Je možné, že královna preferuje samce s vyšším obsahem kutikulárních uhlovodíků.

Následně byla u uhlovodíků C27= a C29= určena poloha dvojné vazby derivatizací s DMDS. U královen bylo zastoupení dvojné vazby v C27= v polohách 7 - 13, u C29= dominovaly polohy 9 a 10. Samci obsahovali dvojnou vazbu převážně v poloze 9.

Za použití citlivějšího splitless modu bylo v extraktech nalezeno a identifikováno 5 látek terpenického a voskového charakteru –  $\alpha$  a  $\beta$ -springen, dihydrofarnesyl-oleát, palmityl-palmitát a palmityl-palmitoleát. Výsledky prokázaly, že podle rozdílného zastoupení těchto látek u jednotlivých skupin, lze pozorovat rozdíly mezi spářenými, nespářenými a o spáření se pokoušejícími jedinci.

Zajímavé jsou především springeny, které byly identifikovány u čmeláků poměrně nedávno<sup>11</sup>. Nespáření samci je vůbec neobsahovali a u spářených se vyskytovaly ve výrazně menším zastoupení proti samcům pokoušejících se o spáření. U královen byly springeny zastoupeny ve všech skupinách. Spářené královny měly proti zbylým skupinám královen statisticky významně nižší zastoupení springenů. Podle tohoto faktu je možné předpokládat přenos springenů z královny na samce během kopulace.

Statisticky významné rozdíly v zastoupení látek byly pozorovány také u dihydrofarnesyl-oleátu, palmityl-palmitátu a palmityl-palmitoleátu. Odlišnosti v zastoupení těchto látek u královen a samců vedly k závěru, že pravděpodobně dochází k jejich přenosu během kopulačního chování ze samce na královnu. Je možné, že tyto látky jsou produkovány labiální žlázou samců.

Výsledky dále ukázaly, že bylo možné rozlišit nespárené královny od zbylých skupin královen. Nespárené královny vůbec neobsahovaly dihydrofarnesyl-oleát, palmityl-palmitoleát a zároveň měly výrazně nižší zastoupení palmityl-palmitátu proti zbylým skupinám královen.

Podle látek identifikovaných při citlivější analýze bylo možné rozlišit nespárené jedince od spárených, stanovit rozdíly mezi jednotlivými skupinami a určit pravděpodobný přenos látek z královen na samce a naopak.

Nalezené rozdíly mezi jedinci otevírají prostor pro další experimenty, díky kterým by bylo možné objasnit biologickou funkci těchto látek v kopulačním chování *BT*. Tyto znalosti by také mohly být velmi užitečné v umělých chovech čmeláků a mohly by přispět k rozvoji chovatelského průmyslu.

## Přehled bibliografických citací:

- (1) Hoskovec M.: *Chem. Listy* **94**, 897-904 (2000).
- (2) Valterová I., Urbanová K.: *Chem. Listy* **91**, 846 - 857 (1997).
- (3) Hefetz A., Taghizahed T., Francké W.: *Z. Naturforsch.* **51**, 409-422 (1996).
- (4) Tengo J., Hefetz A., Bertsch A.: *Comp. Biochem. Physiol.* **99**, 641-646 (1991).
- (5) Levine J.D., Millar J.G.: *Curr. Biol.* **19**, 653-655 (2009).
- (6) Blumberg L.M., David S., Klee F.M.: *J. Chromatogr., A* **1188**, 2–16 (2008).
- (7) Kindl J., Valterová I., Hovorka O.: *Živa* **4**, 169-172 (1998).
- (8) Krieg P., Hofbauer J., Komzáková O.: *Čmeláci a jejich podpora v zemědělské krajině*, VÚVČ., Dol 2009.
- (9) Pavelka M., Smetana V.: *Čmeláci*, Metodika Českého svazu ochránců přírody, Valašské Meziříčí 2003.
- (10) Morse D.H.: *Behavior and Ecology of Bumble Bees*, Academic Press, New York 1979.
- (11) Bertsch A., Schweer H., Tize A.: *Z. Naturforsch.* **59**, 701-707 (2004).
- (12) Vander Meer R.K., Breed M.D., Espelie K.E.: *Pheromone communication in social insect*, Westview Press, Boulder 1998.
- (13) Valterová I., Urbanová K., Hovorka O., Kindl J.: *Z. Naturforsch.* **51**, 430-436 (2001).
- (14) Baer B., Morgan E.D., Schmid-Hempel D.: *PNAS* **98**, 3926-3928 (2001).
- (15) Hovorka O., Urbanová K., Valterová I.: *J. Chem. Ecol.* **24**, 183-193 (1998).
- (16) Nordlund D.A., Lewis W.J.: *J. Chem. Ecol.* **2**, 211-219 (1976).
- (17) Kindl J., Hovorka O., Urbanová K., Valterová I.: *J. Chem. Ecol.* **25**, 1489-1500 (1999).
- (18) Ågren L., Cederberg B., Svensson B.G.: *Zoon* **7**, (1979).
- (19) Bergström G., Bergman., Appelgren M.: *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 515-519 (1996).
- (20) Doorn van A., *Neth. J. Zool.* **37**, 255-276 (1987).
- (21) Mori K.: *Eur. J. Org. Chem.* **8**, 1479-1489 (1998).
- (22) Oldham N. J., Billen J, Morgan E. D.: *Physiol. Entomol.* **19**, 115-123 (1994).
- (23) Šobotník J., Kalinová B., Cahlíková L.: *J. Insect Physiol.* **54**, 204-214 (2008).
- (24) Žáček P., Kalinová B., Šobotník J.: *J. Chem. Ecol.* **35**, 698-705 (2009).
- (25) Krieger G.M., Duchateau M.J., Doorn A.: *J. Chem. Ecol.* **32**, 453-471 (2006).
- (26) Free J. B.: *Pheromones of social bees*, Chapman and Hall, London (1987).

- (27) Bloch G., Hefetz A.: *J. Chem. Ecol.* **25**, 881-896 (1999).
- (28) Jarau S., Žáček P., Šobotník J.: *Naturwissenschaften* **99**, 1039-1049 (2012).
- (29) Jarau S., Hrnčíř M., Zucchi R.: *Naturwissenschaften* **92**, 147-150 (2005).
- (30) Schmitt U.: *Experientia* **46**, 1080-1082 (1990).
- (31) Schmitt U., Lubke G., Francke W.: *Chemoecology* **2**, 35-40 (1991).
- (32) Goulson D., Hawson S. A., Stout J.C.: *Anim. Behav.* **55**, 199-206 (1998).
- (33) Cvačka J., Jiroš P., Šobotník J.: *J. Chem. Ecol.* **32**, 409-433 (2006).
- (34) Cvačka J., Svatoš A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2203-2207 (2003).
- (35) Golub M. A., Wheatherson I.: *Techniques in Pheromone Research*, Springer Verlag, New York 1984.
- (36) Shellie R.A., Welthagen W., Zrostlíková J.: *J. Chromatogr., A* **1086**, 83-90 (2005).
- (37) Oldham N.J., Svatoš A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 331-336 (1999).
- (38) Scribe P., Guezenec, J., Dagaut, J.: *Anal. Chem.* **60**, 928-931 (1988).
- (39) Bartle K.D., Myers P.: *Trends Anal. Chem.* **21**, 547-557 (2002).
- (40) Giddings J.C.: *J. Chromatogr., A* **703**, 3-15 (1995).
- (41) Liu Z., Philips J.B.: *J. Chromatogr. Sci.* **29**, 227-231 (1991).
- (42) Beens J., Tijssena R., Blomberg B.: *J. Chromatogr., A* **822**, 233-251 (1998).
- (43) Philips J.B., Beens J.: *J. Chromatogr., A* **856**, 331 –347 (1999).
- (44) Górecki T., Harynuk J., Panić O., *J. Sep. Sci.* **27**, 359-379 (2004).
- (45) Bruckner C.A., Prazen B.J., Synovec R.E.: *Anal. Chem.* **70**, 2796-2804 (1998).
- (46) Llu Z., Sirimanne S., Patterson D.G., Needham L.L.: *Anal. Chem.* **66**, 3086-3092 (1994).
- (47) Venkatramani C.J., Xu J., Phillips J.B.: *Anal. Chem.* **68**, 1486-1492 (1996).
- (48) Bertsch W.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **22**, 647–665 (1999).
- (49) Rowe K., Davis J.M.: *Anal. Chem.* **67**, 2981-2993 (1995).
- (50) Schoenmakers P.J., Oomen J.L., Bomberg J.: *J. Chromatogr., A* **892**, 29-46 (2000).
- (51) Beens J., Blomberg J., Schoenmakers P.J.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **23**, 182-188 (2000).
- (52) Frysinger G.S., Gaines R.B.: *J. Forensic Sci.* **47**, 471-482 (2002).
- (53) Shellie R., Marriot P.: *Anal. Chem.* **74**, 5426-5430 (2002).
- (54) Gaines R.B., Ledford E.B., Stuart J.D.: *J. Microcolumn Sep.* **10**, 597-604 (1998).
- (55) Ruotolo B.T., Verbeck G.F., Thomson L.M.: *Anal. Chem.* **76**, 6727-6733 (2004).

- (56) Duinker J.C., Schulz D.E., Petrick G.: *Anal. Chem.* **60**, 478-482 (1988).
- (57) Focant J.F., Sjodin A., Turner E.W.: *Anal. Chem.* **76**, 6313-6320 (2004).
- (58) Phillips J.B., Venkatramani C.J.: *J. Microcolumn Sep.* **5**, 511-516 (1993).
- (59) Geus H.J., Boer J., Phillips J.B., E.B.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **21**, 411-413 (1998).
- (60) Francis W. G.; Veland, K.: *J. Chromatogr.* **219**, 379-384 (1981).
- (61) Carlson D.A., Hector J.: *Anal. Chem.* **61**, 1564-1571 (1989).
- (62) Yuan G., Yan J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 11-14 (2002).
- (63) Harris D.C.: Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman and Company, Seventh edition, New York 2007.
- (64) Meloun M., Militký J.: *Kompendium statistického zpracování dat*, Academia, druhé vydání, Praha 2006.
- (65) Khorasheh F., Gray M.R., Selucky M.L.: *J. Chromatogr., A* **481**, 1-16 (1989).